



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# METODY DEKOTOXIFIKACE HYDROLYZÁTŮ LIGNOCELULÓZOVÝCH MATERIÁLŮ

DETOXIFICATION OF LIGNOCELLULOSE HYDROLYZATES

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Monika Vašíčková

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2017

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1000/2016  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Monika Vašíčková**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**  
Akademický rok: 2016/17

### Název diplomové práce:

Metody detoxifikace hydrolyzátů lignocelulózových materiálů

### Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše
2. Příprava a charakterizace hydrolyzátů lignocelulózových materiálů
3. Studium možných přístupů k jejich detoxifikaci

**Termín odevzdání diplomové práce: 5. 5. 2017**

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

---

Bc. Monika Vašíčková  
student(ka)

---

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.  
vedoucí práce

---

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

---

prof. Ing. Martin Weiter, Ph. D.

děkan

V Brně dne 31. 1. 2017

## ABSTRAKT

Cílem diplomové práce bylo studium detoxifikace hydrolyzátů lignocelulózových materiálů a také studium vhodnosti dřevěných pilin jako substrátu pro mikrobiální produkci PHA bakteriemi *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*. V experimentální části práce byl zkoumán nejvhodnější způsob detoxifikace modelového a reálného hydrolyzátu, použité detoxifikační postupy zhodnoceny co do jejich vlivu na obsah polyfenolů jako nejvýznamnějších mikrobiálních inhibitorů a redukujících sacharidů, které naopak plní funkci klíčového uhlíkatého substrátu. Zároveň byl i ověřen vliv detoxifikačních postupů na biotechnologickou produkci PHA. *Burkholderia sacchari* měla v porovnání s *Burkholderia cepacia* vyšší schopnost akumulace PHA. Dále lze tedy konstatovat, že jako nejefektivnějším postupem detoxifikace se jevil tzv. overliming. Při kultivaci *Burkholderia sacchari* na médiu detoxifikovaného overlimingem reálného hydrolyzátu pilin bylo dosaženo výrazného zvýšení obsahu PHB v biomase. Nicméně, celkově byly výtěžky PHB spíše nízké a dřevěné piliny tedy nemohou být považovány za slibný substrát pro průmyslovou produkci PHB.

## ABSTRACT

The aim of this work was study of the detoxification of lignocellulose material hydrolysates and to investigate sawdust suitability as a substrate for microbial production of PHA by bacteria *Burkholderia cepacia* and *Burkholderia sacchari*. In the experimental part of the work the most suitable way of detoxification of model and real hydrolysate was studied. After that, detoxification methods used were evaluated. Criteria for evaluation were concentration of polyphenols as the most important microbial inhibitors and reduction saccharides as the main carbon substrate. Furthermore, fermentability of the hydrolysates was also tested by cultivation of two bacteria capable of PHA accumulation. *Burkholderia sacchari* demonstrated higher ability to accumulate PHA than *Burkholderia cepacia*. Then in the summary – most effective way for detoxification was 'overliming'. Major increase of PHB in biomass was obtained when *Burkholderia sacchari* was cultivated on media gained by application of overliming of real lignocellulose hydrolysate. However, total gains of PHB were more likely low and then sawdust can not be considered as a substrate for PHB production at industrial scale.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Lignocelulózový materiál, detoxifikace, polyhydroxyalkanoáty, polyhydroxybutyrát, modelový hydrolyzát, reálný hydrolyzát z pilin, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari*

## KEYWORDS

Lignocellulose material, detoxification, polyhydroxyalkanoates, polyhydroxybutyrate, model hydrolysate, real hydrolysate from sawdust, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari*

VAŠÍČKOVÁ, M. *Metody detoxifikace hydrolyzátů lignocelulózových materiálů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 54 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za jeho odborné rady a trpělivost při zpracování tématu a výsledků. Za ochotu a pomoc při práci v laboratoři bych chtěla poděkovat Ing. Pavle Benešové a Ing. Danu Kučerovi a také všem, co se mnou pracovali. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala svojí rodině a přátelům za velkou podporu.

# **OBSAH**

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>9</b>
2.1	Lignocelulózové materiály .....	9
2.1.1	Lignocelulózová biomasa .....	9
2.1.2	Chemická struktura a základní složky .....	9
2.1.2.1	Celulóza .....	10
2.1.2.2	Hemicelulóza .....	10
2.1.2.3	Lignin .....	11
2.1.3	Zdroje lignocelulózové biomasy .....	11
2.2	Předúprava lignocelulózových materiálů .....	12
2.2.1	Fyzikální předúpravy .....	13
2.2.1.1	Mechanické rozměňování .....	13
2.2.1.2	Pyrolýza .....	13
2.2.1.3	Hydrotermální zpracování .....	13
2.2.1.4	Sonifikace .....	13
2.2.2	Fyzikálně-chemické předúpravy .....	14
2.2.2.1	Exploze vodní parou .....	14
2.2.2.2	Amoniakální exploze (AFEX) .....	14
2.2.2.3	Předúprava horkou vodou .....	14
2.2.3	Chemické předúpravy .....	14
2.2.3.1	Ozonolýza .....	15
2.2.3.2	Alkalická předúprava .....	15
2.2.3.3	Kyselá předúprava .....	15
2.2.3.4	Peroxid vodíku .....	15
2.2.4	Biologické předúpravy .....	15
2.3	Hydrolýza lignocelulózových materiálů .....	15
2.3.1	Kyselá hydrolýza .....	16
2.3.2	Enzymatická hydrolýza .....	17
2.4	Detoxifikace hydrolyzátů .....	18
2.4.1	Biologické detoxifikační metody .....	18
2.4.2	Fyzikální detoxifikační metody .....	18
2.4.3	Chemické detoxifikační metody .....	18
2.4.4	Kombinace detoxifikačních metod .....	19

2.5	Polyhydroxyalkanoáty.....	19
2.5.1	Historie .....	20
2.5.2	Vlastnosti .....	20
2.5.3	Chemická struktura.....	20
2.5.4	Druhy PHA .....	21
2.5.4.1	Polyhydroxybutyrát (PHB) .....	21
2.5.4.2	PHB-PHV .....	21
2.5.5	Struktura intracelulárních granulí PHA .....	22
2.5.6	Mikroorganismy produkující PHA .....	23
2.5.6.1	Burkholderia cepacia .....	23
2.5.6.2	Burkholderia sacchari .....	24
2.5.7	Biodegradace PHA .....	24
2.5.8	Využití polyhydroxyalkanoátů .....	24
2.5.8.1	Scaffoldy v tkáňovém inženýrství.....	24
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>26</b>
3.1	Použité chemikálie, přístroje a mikroorganismy .....	26
3.1.1	Použité mikroorganismy .....	26
3.1.2	Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů .....	26
3.1.3	Standardní chemikálie .....	26
3.1.4	Ostatní chemikálie .....	26
3.1.5	Použité přístroje.....	26
3.2	Příprava roztoků.....	27
3.2.1.....	Roztok 3,5-dinitrosalicylové kyseliny pro stanovení redukujících sacharidů .....	27
3.3	Příprava modelového a reálného hydrolyzátu lignocelulózy.....	27
3.3.1	Modelový hydrolyzát.....	27
3.3.2	Chemická hydrolýza dřevěných pilin .....	27
3.4	Stanovení koncentrace redukujících sacharidů pomocí 3,5-dinitrosalicylové kyseliny .....	28
3.4.1	Stanovení kalibrační přímky.....	28
3.5	Stanovení celkových polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteovi metody.....	28
3.5.1	Stanovení kalibrační přímky.....	28
3.6	Stanovení koncentrace organických kyselin pomocí iontové chromatografie	28
3.7	Stanovení PHA pomocí plynové chromatografie (GC) .....	29

3.7.1	Stanovení kalibrační křivky PHA.....	29
3.7.2	Stanovení PHA v biomase.....	29
3.8	Gravimetrické stanovení biomasy v jednotlivých kultivacích.....	29
3.9	Detoxifikace hydrolyzátů.....	29
3.10	Kultivace bakterií <i>Burkholderia cepacia</i> a <i>Burkholderia sacchari</i> a kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	30
3.10.1	Příprava inokula pro mikroorganismy.....	30
3.10.2	Živná média .....	30
3.10.2.1	Pro bakterie .....	30
3.10.2.2	Pro kvasinku .....	30
3.10.3	Zaočkování bakterií a kvasinek .....	30
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b>	<b>32</b>
4.1	Kalibrace metod .....	32
4.1.1	.....Kalibrace stanovení redukujících sacharidů pomocí 3,5-dinitrosalicylové kyseliny .....	32
4.1.2	Stanovení celkových polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteovým činidlem .	33
4.1.3	Stanovení obsahu P(3HB) v biomase pomocí plynové chromatografie...	34
4.2	Detoxifikace hydrolyzátů.....	35
4.2.1	Vliv detoxifikace na koncentraci polyfenolů.....	35
4.3	Vliv detoxifikace na koncentraci redukujících sacharidů .....	36
4.4	Stanovení koncentrace organických kyselin v modelovém hydrolyzátu pomocí iontové chromatografie .....	39
4.5	Biotechnologická produkce PHB na hydrolyzátech .....	39
4.6	Výtěžky biomasy a PHB.....	43
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA</b>	<b>50</b>

## 1 ÚVOD

Celosvětová výroba plastů v roce 2014 činila 311 milionů tun. V Evropě bylo vyrobeno zejména ve stejném roce 59 milionů tun plastů. Velké množství je důsledkem rostoucí poptávky a v Evropě je to přibližně 47,8 milionů tun ročně. Neustálá poptávka po plastových materiálech na trhu je způsobena jejich mimořádnými vlastnostmi, jako jsou: nízká cena, trvanlivost, lehkost a tvárnost. Tyto faktory dělají plasty univerzálními, a proto je možné je využít v mnoha komerčních oblastech. Na druhé straně, „tradiční“ plasty, které nejsou biologicky rozložitelné a vedou k hromadění odpadů, mohou v přírodě zůstat stovky let. Tento problém by mohl být částečně vyřešen recyklací těchto odpadů. V současné době je však účinně recyklováno jen malé množství těchto odpadů. V roce 2014, bylo v Evropě recyklováno pouze 29,7 % plastových odpadů. Dalším možným řešením tohoto problému je výroba bioplastů, které jsou biokompatibilní a biologicky odbouratelné – biodegradabilní. V roce 2014 celosvětová výroba těchto produktů byla menší než 1 % z celkového objemu produkce plastů. Pro rok 2019 se předpokládá, že roční výroba bioplastů by měla dosáhnout téměř 7,8 mil. tun. Mezi hlavní omezení, které zpomalují produkci bioplastů jsou vysoké výrobní náklady a jejich fyzikální vlastnosti, které stále nemohou konkurovat na trhu. Mezi obnovitelné suroviny používané k výrobě bioplastů patří škrob, celulóza, lignin, proteiny a mnoho dalších zdrojů. Tyto vstupní materiály mohou pocházet z obou potravinářských plodin, jako je kukuřice, cukrová třtina, a také komunální a zemědělsko-průmyslové odpady. Mezi bioplasty patří například tzv. polyhydroxyalkanoáty (PHA). Jsou obzvláště zajímavé, neboť se jedná o termoplasty. Kromě toho, tyto biopolymery jsou trvale udržitelné, protože mohou být vyráběny z obnovitelných zdrojů a jsou zcela biologicky odbouratelné. PHA jsou bio-polyestery produkované v bakteriálních buňkách, kde se hromadí ve formě granulí, které bakteriím slouží jako zásobárna energie.

Hydrolýza dřeva zředěnou kyselinou sírovou je dobře známý způsob pro získání fermentovatelných hydrolyzátů, které mohou být použity například jako surovina pro výrobu PHA. Nicméně, tyto hydrolyzáty obsahují nejen fermentovatelné cukry, ale také některé furanové sloučeniny, jako je furfural a 5-hydroxymethylfurfural, které jsou produktem degradace fenolické sloučeniny (vznikají například degradací ligninu) a další mikrobiální inhibitory. Tyto sloučeniny v hydrolyzátech inhibují fermentaci cukrů. Proto je pro dosažení vysoké zkvasitelnosti nutné detoxikovat hydrolyzáty před fermentací pro odstranění inhibičních sloučenin. Pro zlepšení zkvasitelnosti z dřevěných hydrolyzátů, je možné využít tzv. detoxikační metody jako je například extrakce pomocí organických rozpouštědel, odpařování, sulfátové léčby, iontoměnič případně jiných sorbentů, anebo ošetření enzymem.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Lignocelulózové materiály

#### 2.1.1 Lignocelulózová biomasa

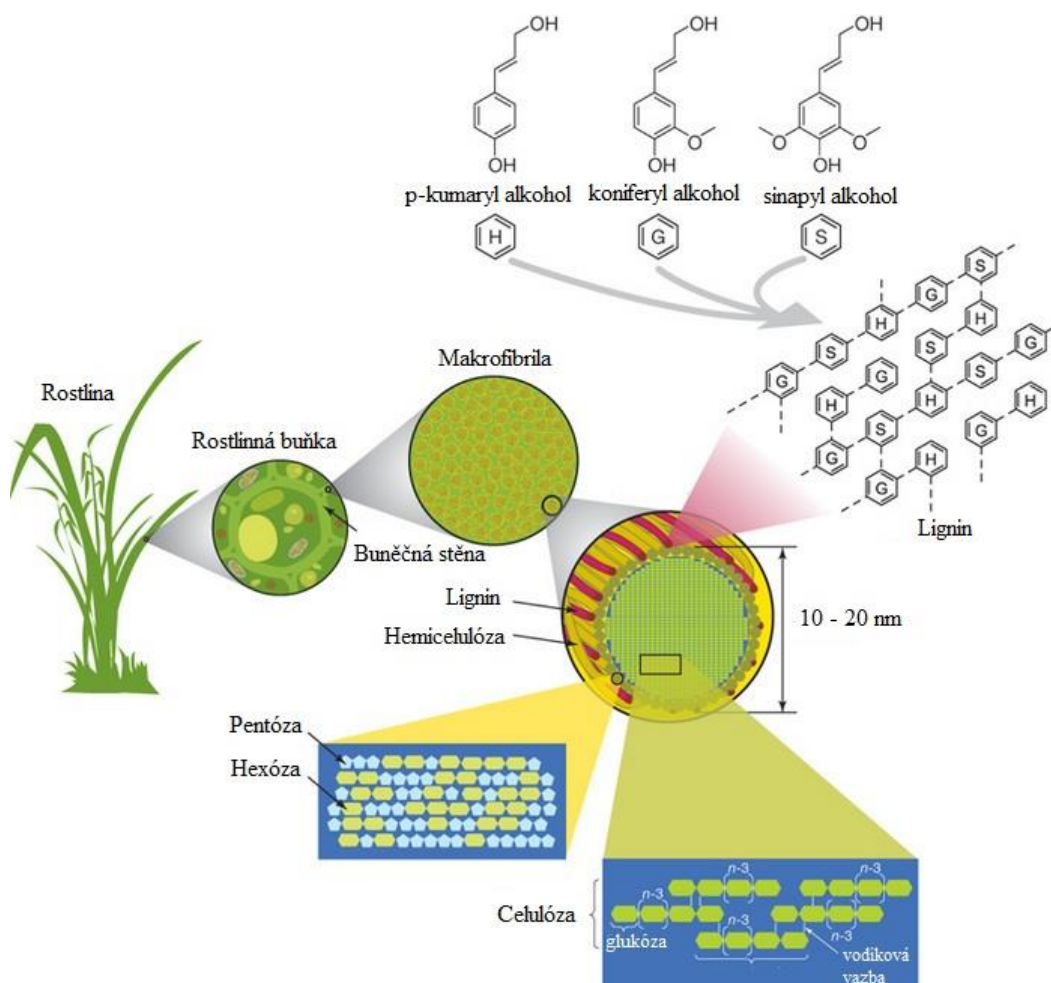
Lignocelulózové materiály mohou být rozděleny do čtyř skupin podle druhu zdroje: [1]

- (1) lesní zbytky,
- (2) tuhý komunální odpad,
- (3) sběrný papírový odpad,
- (4) zbytky rostlin [1]

#### 2.1.2 Chemická struktura a základní složky

Lignocelulóza se skládá především ze tří složek (celulóza, hemicelulóza a lignin), které zaujímají asi 90 % sušiny Lignocelulózový materiál je tvořen především celulózou (40-50 %), dále hemicelulózou (20-25 %) a ligninem (15-20 %). Kromě těchto tří složek obsahuje také malé množství minerálních látek, tuků, rozpustných sacharidů a ostatních látek. Zatímco celulóza je jednotnou součástí většiny typů biomasy, složení hemicelulóz a ligninu se druhově liší. Chemické rozdíly mezi surovinami mají zásadní vliv na vznik inhibitorů během přípravy hydrolyzátů. [1],[2],[3]

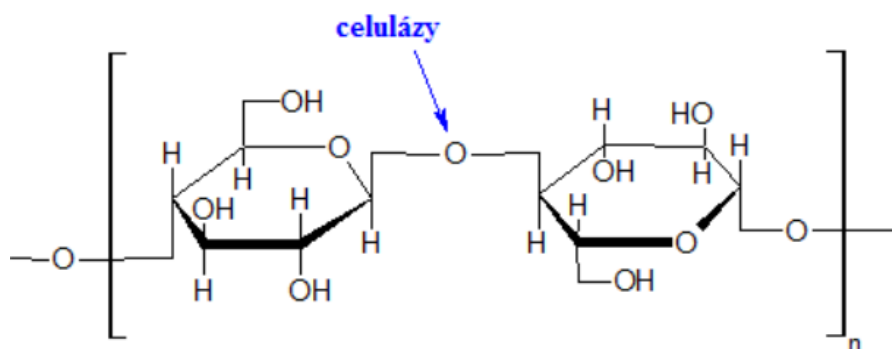
Snadným a zajímavým zdrojem lignocelulózy je sláma, kukuřičné stonky, měkké dřevo nebo také použitý kancelářský papír. Tvrdé dřevo obsahuje větší podíl celulózy + hemicelulózy (78 %) než měkké dřevo, kdežto obsah ligninu je v měkkém dřevě (29 %) vyšší než v dřevě tvrdém (21 %). [1],[2],[3]



Obrázek 1: Základní složky lignocelulózy [4]

### 2.1.2.1 Celulóza

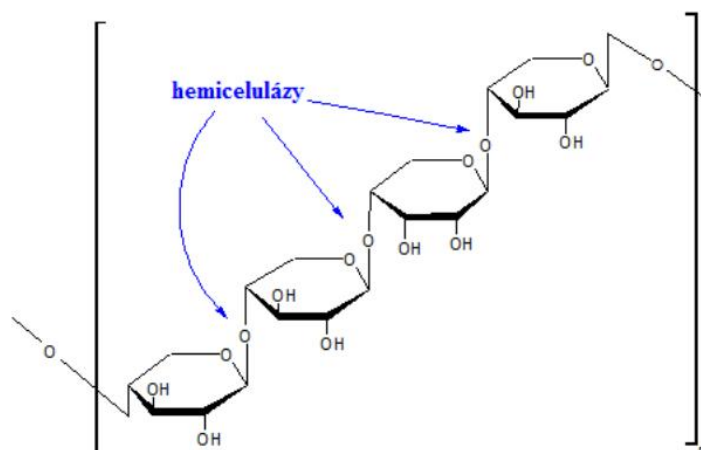
Celulóza, stavební složka rostlinných buněk, je lineární homopolysacharid složený z glukózových jednotek spojených  $\beta$ -1,4-glykosidickými vazbami. Je nerozpustná ve vodě a je velmi odolná vůči depolymerizaci. Ačkoli má celulóza velmi podobné chemické složení jako škrob, vazby mezi molekulami glukózy způsobují rozdílnost struktury. Přírodní celulóza může mít stupeň polymerace až 15 000, kde jednotlivé molekuly tvoří mikrofibrily stabilizované vodíkovými vazbami, čímž je makromolekula vysoce krystalická a je obtížné ji hydrolyzovat. [2],[3]



Obrázek 2: Chemický vzorec celulózy [5]

### 2.1.2.2 Hemicelulóza

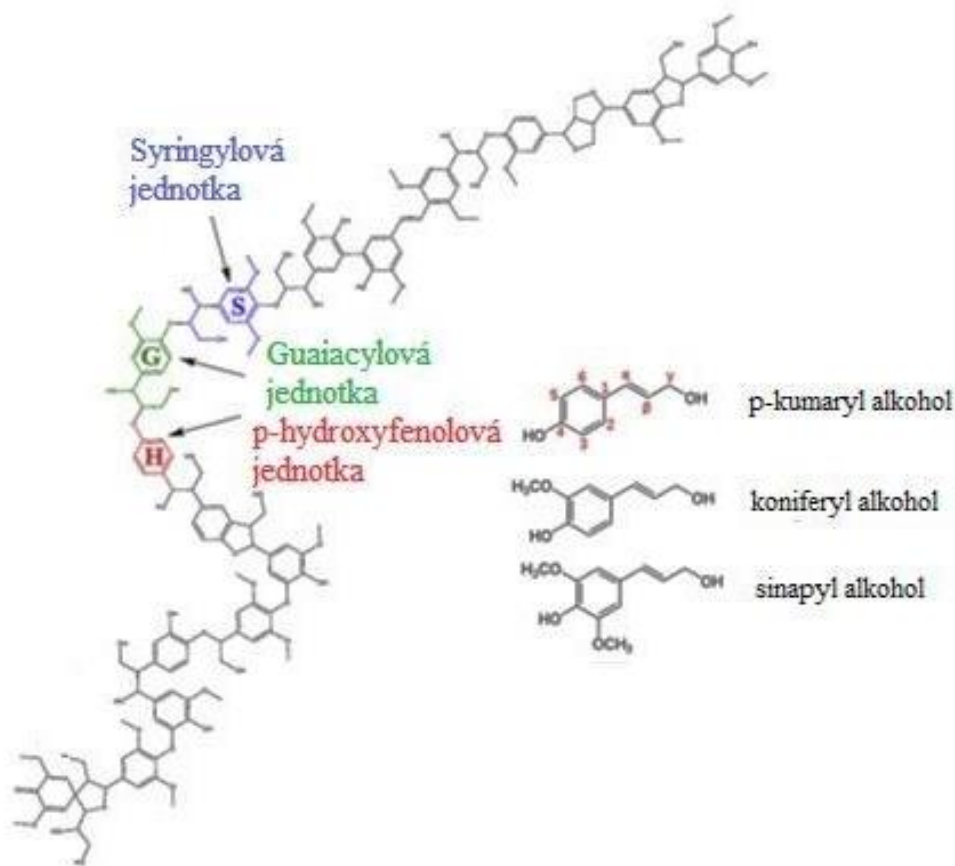
Na rozdíl od celulózy se jedná o heteropolysacharid, který je často rozvětvený. K celulóзовým mikrofibrilám se váže vodíkovými vazbami, přičemž vzniká síť, která tvoří základ buněčné stěny rostlin. Molekuly hemicelulózy mají xylanovou resp. glukonovou kostru s množstvím postranních řetězců substituovaných různými minoritními sacharidy, např. manózou, glukózou, xylózou, arabinózou, galaktózou, kyselinou glukuronovou apod. Hemicelulóza má nízký stupeň polymerace a relativně snadno podléhá hydrolýze. Hydrolýza hemicelulózy vede ke vzniku pentóz (převládající v tvrdém dřevě), hexóz (zejména v měkkém dřevě) a uronových kyselin. Kyselina octová, která je výsledkem hydrolýzy acetylových skupin, je další důležitou složkou hydrolyzátů tvrdého dřeva. Navíc hemicelulóзовé hydrolyzáty vytvořené v průběhu předběžného zpracování obecně obsahuje fenolické kyseliny. Zastoupení jednotlivých sacharidů a stupeň větvení je závislý na rostlině, ze které daný materiál pochází. [2],[3]



Obrázek 3: Chemický vzorec hemicelulózy [5]

### 2.1.2.3 Lignin

Lignin je složitý aromatický polymer skládající se z fenylypropanových jednotek: p-kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol. Tyto tři jednotky mohou za nerozpustnost ligninu ve vodě, strukturální tuhost a odolnost buňky vůči různým chorobám a škůdcům. Jsou propojeny prostřednictvím komplexní sítě éterových vazeb a vazeb uhlík-uhlík. V lignocelulózové biomase je lignin spojen s celulózą a hemicelulózą jak chemicky tak i fyzikálně, kde tyto tři složky poskytují strukturální podporu a nepropustnost do buněčné stěny. Kovalentně se váže esterovými vazbami na postranní řetězce hemicelulózy přes kyselinu ferulovou. Tedy váže dohromady části buněčné stěny, čemuž dává biomase strukturu. Pro zpracování lignocelulózy jsou podstatné fenolické sloučeniny, jako jsou p-kumarová, ferulová a diferulová kyselina. Ty nejsou ligninovými složkami, ale přispívají k zesílení hemicelulózy. V měkkém suchém dřevě je ho zastoupeno asi kolem 25-39 % a ve dřevě tvrdém kolem 17-32 %. [2],[3],[6]



Obrázek 4: Struktura ligninu [6]

### 2.1.3 Zdroje lignocelulózové biomasy

Zdroje lignocelulózové biomasy lze rozdělit do několika skupin:

- ✓ energetické plodiny (vytrvalé trávy a jiné specializované energetické plodiny),
- ✓ vodní rostliny (vodní hyacint), lesní biomasa a odpady (měkké dřevo a tvrdé dřevo, piliny, kůra),
- ✓ zemědělské zbytky (bagasa), a organické složky tuhého komunálního odpadu.

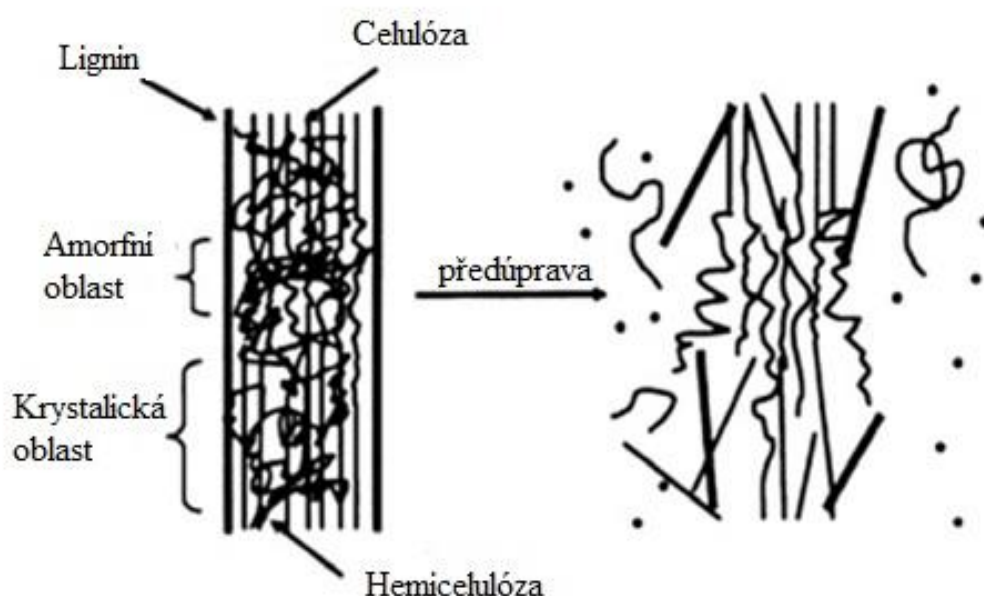
Tyto zdroje biomasy se zdají být největší, nejnadějnější, nejbohatší a jsou k dispozici po celém světě. Lesní biomasa zahrnuje zejména dřevité materiály, jako je tvrdé a měkké dřevo, zatímco lesními odpady jsou piliny, zbytky kůry, štěrky a větve od odumřelých stromů. [7]

V USA se spotřebuje ročně až 370 milionů tun dřeva. Ostatní země bohaté na lesy jako je Kanada, Rusko, Brazílie a Čína tvoří dohromady více než polovinu celkové lesní plochy na světě. [7]

Měkká dřeva, mezi něž patří borovice, cedr, smrk, cypřiš, jedle, jedlovec, a sekvoje, mají nižší hustotu a rychlejší růst. Kdežto dřeva tvrdá se nacházejí hlavně na severní polokouli a mezi ně například patří topol, vrba, dub a osika. [7]

## 2.2 Předúprava lignocelulózových materiálů

Předběžná úprava lignocelulózové biomasy je vnímána jako jeden z nejvíce nákladných zpracovatelských kroků v rámci přeměny biomasy na zkvasitelné cukry. Celulóza v lignocelulózové biomase je obvykle pokryta hemicelulózou, kdy obě tyto složky tvoří celulózo-hemicelulózový komplex, který slouží jako chemická bariéra a zabraňuje přístupu enzymům do tohoto komplexu. Celulózo-hemicelulózový komplex je dále zapouzdřen s ligninem a tím vytváří fyzikální bariéru pro enzymatickou hydrolýzu biomasy k produkci zkvasitelných cukrů. Z tohoto důvodu je právě nutná předúprava pro odstranění/narušení lignino-celulózo-hemicelulózového komplexu, které umožní přístup hydrolytických enzymů, které přeměňují celulózu a hemicelulózu na fermentovatelné cukry. Tyto úpravy biomasy nastávají během předběžného zpracování, kdy v podstatě dochází k odstranění ligninu, snížení krystalinity celulózy, zvýšení povrchové plochy a pórovitosti biomasy. V průběhu předběžného zpracování vzniká řada inhibitorů a to degradací hemicelulózy nebo ligninu. Tvorba inhibičních látek je závislá na způsobu předúpravy. [1],[2],[3]



Obrázek 5: Schéma předúpravy lignocelulózového materiálu [1]

V dnešní době je známo mnoho metod pro předběžnou úpravu lignocelulózy. Tyto metody byly dobře zkoumány a každý způsob předúpravy má jak výhody, tak i nevýhody. [7] Nicméně aby byl způsob předúpravy lignocelulózového materiálu účinný, měl by splňovat některé obecné podmínky:

- ✓ Je třeba uvolnit celulózu a hemicelulózu z lignocelulózového komplexu a pozměnit jejich uhlovodíkové polymery pro lepší stravitelnost enzymů k produkci zkvasitelných cukrů.

- ✓ Mělo by dojít k minimálnímu poškození hemicelulózy a celulózy a maximální návratnosti těchto polysacharidů.
- ✓ Nemělo by dojít k degradaci či k úplné ztrátě cukrů a také ke vzniku mikrobiálních inhibitorů.
- ✓ Mělo by se vytvořit minimální množství toxických sloučenin po předúpravě lignocelulózy.
- ✓ Měl by vzniknout vysoký výtěžek biomasy s vysokou kompatibilitou fermentace.
- ✓ Měla by být prokázána vysoká obnova ligninu pro výrobu cenných vedlejších produktů.
- ✓ Měla by vyžadovat minimální spotřebu tepla a energie a také nízké investiční a provozní náklady. [7]

Metody předběžné úpravy mohou být obecně rozděleny do čtyř skupin:

- ✓ fyzikální,
- ✓ chemické,
- ✓ fyzikálně-chemické,
- ✓ biologické. [7]

### **2.2.1 Fyzikální předúpravy**

Fyzikální předúpravy pracují na zvýšení dostupného povrchu biomasy, objemu pórů, snížení stupně polymerace celulózy a její krystalizace, hydrolýze hemicelulózy a částečné depolymeraci ligninu. Energetický požadavek pro fyzikální předúpravu závisí na konečné velikosti částic a snížení krystalinity lignocelulózy. Fyzikální metody předzpracování jsou drahé a jsou obvykle nepoužitelné pro velké zpracování. [7]

#### **2.2.1.1 Mechanické rozmělnění**

Lignocelulóзовé materiály mohou být rozmělněny kombinací sekání, mletí, frézování a to kvůli snížení krystalinity celulózy. Výkon mechanického rozmělnění závisí na požadované velikosti částic a vlastnostech biomasy. Tyto mechanické předupravovací techniky jsou časově a energeticky náročné a také nákladné. [1]

#### **2.2.1.2 Pyrolýza**

Pyrolýzu lze také použít pro předběžné zpracování lignocelulóзовých materiálů, a to vzhledem k tomu, že biomasa může být použita jako substrát pro tepelnou přeměnu celulózy a hemicelulózy na fermentovatelné cukry s dobrými výtěžky. [1]

#### **2.2.1.3 Hydrotermální zpracování**

Pro předúpravu lignocelulóзовé biomasy je zde používána voda v kapalně nebo v plynné fázi. Jedná se o poměrně šetrný způsob, který nevyžaduje žádné katalyzátory a nezpůsobuje korozi. Pod vysokým tlakem voda proniká do biomasy, kde hydratuje celulózu a odstraňuje většinu hemicelulózy a menší část ligninu. Solubilizace hemicelulóz je katalyzována hydroxoniovými ionty vznikající autoionizací vody. Řízení pH kolem neutrálních hodnot minimalizuje vznik mikrobiálních inhibitorů. [2]

#### **2.2.1.4 Sonifikace**

Tento způsob předúpravy mechanicky rozrušuje lignocelulóзовou biomasu. Dochází k redukci velikosti částic při frekvenci 20 – 40 kHz, což je hlavním efektem ultrazvukového působení. Použitím větší frekvence dochází k formaci radikálů  $\text{OH}^\cdot$  a  $\text{HO}_2^\cdot$ , což má za následek oxidaci pevné složky. [8]

## 2.2.2 Fyzikálně-chemické předúpravy

Fyzikálně-chemické předúpravy využívají takové podmínky a sloučeniny, které mají vliv na fyzikální a chemické vlastnosti biomasy. Zahrnují velký počet technologií jako je např. exploze vodní parou, amoniakální exploze, pronikání recyklovaného čpavku, napouštění vodným amoniakem, mokrá oxidace, exploze CO<sub>2</sub> atd. Stejně jako ostatní metody, také zvyšují přístup k povrchu biomasy pro dostupnost enzymů, snižují krystalinitu celulózy a odstraňují hemicelulózu a lignin. [7]

### 2.2.2.1 Exploze vodní parou

Je nejčastěji používanou metodou pro předúpravu lignocelulóзовých materiálů. V této metodě se biomasa zpracovává pod vysokým tlakem nasycené páry, následně se tlak rychle snižuje, čímž jsou materiály podrobeny prudkému rozkladu. Parní exploze, ve srovnání s jinými metodami, je metodou méně nákladnou, má výrazně nižší dopad na životní prostředí, je energeticky účinnější a pracuje s méně nebezpečnými chemickými látkami. Parní exploze je zahájena při teplotě 160 – 260 °C s příslušným tlakem 0,69 - 4,83 MPa po dobu několika sekund a následně dochází k prudkému poklesu tlaku na atmosférický, čímž je materiál ochlazen. [1]

### 2.2.2.2 Amoniakální exploze (AFEX)

V tomto procesu je materiál vystaven kapalnému amoniaku při vysoké teplotě a tlaku, a následně rychlé dekompresi, což způsobuje rychlé zcukernění lignocelulóзовého materiálu. Nedochozí k přímému uvolňování cukrů, ale polymery (hemicelulóza a celulóza), které jsou enzymaticky napadeny, jsou přeměněny na cukry. Dřevní materiály vyžadují přibližně 2 g amoniaku na 1 g biomasy při teplotě 200 °C po dobu 30 minut. Nevýhodou této metody je, že přehřátá pára amoniaku musí být recyklována tak, aby nedošlo k poškození životního prostředí. [1],[8]

### 2.2.2.3 Předúprava horkou vodou

Je jedna z metod hydrotermálních předúprav lignocelulóзовých materiálů, která vystavuje biomasu na určitou dobu teplé vodě (160 – 240 °C) a vysokému tlaku, což má za následek zvýšené využití pentóz a vytváření malého množství inhibitorů. Úkolem této metody je odstranění hemicelulózy, kde je rozpuštěno 40 - 60 % celkové hmotnosti z čehož je 4 – 22 % celulóza a 35 – 60 % lignin. Pokud je hodnota pH udržována mezi 4 a 7, degradace monosacharidů je minimální. [1]

## 2.2.3 Chemické předúpravy

Chemické předběžné úpravy zahrnují zejména zásady a kyseliny, které působí na biomasu během delignifikace pro snížení stupně polymerace a krystalinity celulózy. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a HNO<sub>3</sub> se používají při kyselém předzpracování biomasy. Mezi chemikáliemi, kyselina sírová je nejčastěji používaná kyselina, zatímco hydroxid sodný je hlavní zásada. Kyselá předúprava se používá k rozpuštění hemicelulóзовé frakce v biomase pro lepší přístup enzymů k celulóze. Organické kyseliny, jako fumarová a maleinová, jsou používány pro zvýšení celulóзовé hydrolýzy a snížení produkci inhibitorů. Dále se používají zásaditý H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ozon, glycerol, dioxan, fenol nebo ethylenglykol, u kterých je známo, že narušují strukturu celulózy a podporují hydrolýzu. Koncentrované minerální kyseliny (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl), rozpouštědla na bázi čpavku (NH<sub>3</sub>, hydrazin), aprotická rozpouštědla (DMSO), kovové komplexy (vinan sodno-železitý, kadoxen a cuoxam) a mokré oxidace snižují krystalinitu celulózy, narušují sdružení ligninu s celulózou, a také rozpouštějí hemicelulózu. [7]

#### **2.2.3.1 Ozonolýza**

V této předúpravě dochází při pokojové teplotě, kdy je použit ozon za účelem oddělení ligninu od hemicelulózy a zvýšení biologické rozložitelnosti celulózy. Proces je velmi účinný v odstranění ligninu bez tvorby toxických vedlejších produktů. Nevýhodou ozonolýzy je velká spotřeba ozónu, která dělá tento proces velmi nákladným. [1]

#### **2.2.3.2 Alkalická předúprava**

Alkalická úprava může být použita pro odstranění ligninu, čímž se zvyšuje stravitelnost celulózy. Ve srovnání s metodami na bázi kyseliny a hydrotermálního zpracování, vede mírně alkalická předúprava k menší rozpustnosti hemicelulóz a menší tvorbě inhibičních sloučenin, které mohou být provozovány při nižších teplotách. Hydroxid sodný (NaOH) a hydroxid draselný (KOH) jsou nejčastěji používanými zásadami. Jinými vhodnými alkáliemi mohou být hydroxid vápenatý a amoniak, které se využívají například k předúpravě vápna nebo také k expanzi čpavkových vláken. [2]

#### **2.2.3.3 Kyselá předúprava**

Kyselá hydrolýza je jedním z nejslibnějších předúprav s ohledem na průmyslové provedení. Předúprava je obvykle prováděna s minerálními kyselinami, je také možné použít organické kyseliny a oxid siřičitý. Předčištění lignocelulózové biomasy zředěnou kyselinou má za následek vzniku vysokého obsahu hemicelulózových cukrů. Předzpracování kyselinou má také některé nevýhody, jako jsou například vysoké náklady na materiály použitých pro konstrukci reaktorů, tvorba síranu vápenatého při neutralizaci a tvorba inhibičních vedlejších produktů. [2]

#### **2.2.3.4 Peroxid vodíku**

Enzym peroxidáza v přítomnosti peroxidu vodíku může katalyzovat biodegradaci ligninu. Touto metodou bylo rozpuštěno asi 50 % ligninu a většina hemicelulózy působením 2 % roztoku  $H_2O_2$  při teplotě 30 °C po dobu 8 hodin působení. V procesu zcukření bylo získáno asi 95 % glukózy z celulózy za 24 hodin při 45 °C. [5]

#### **2.2.4 Biologické předúpravy**

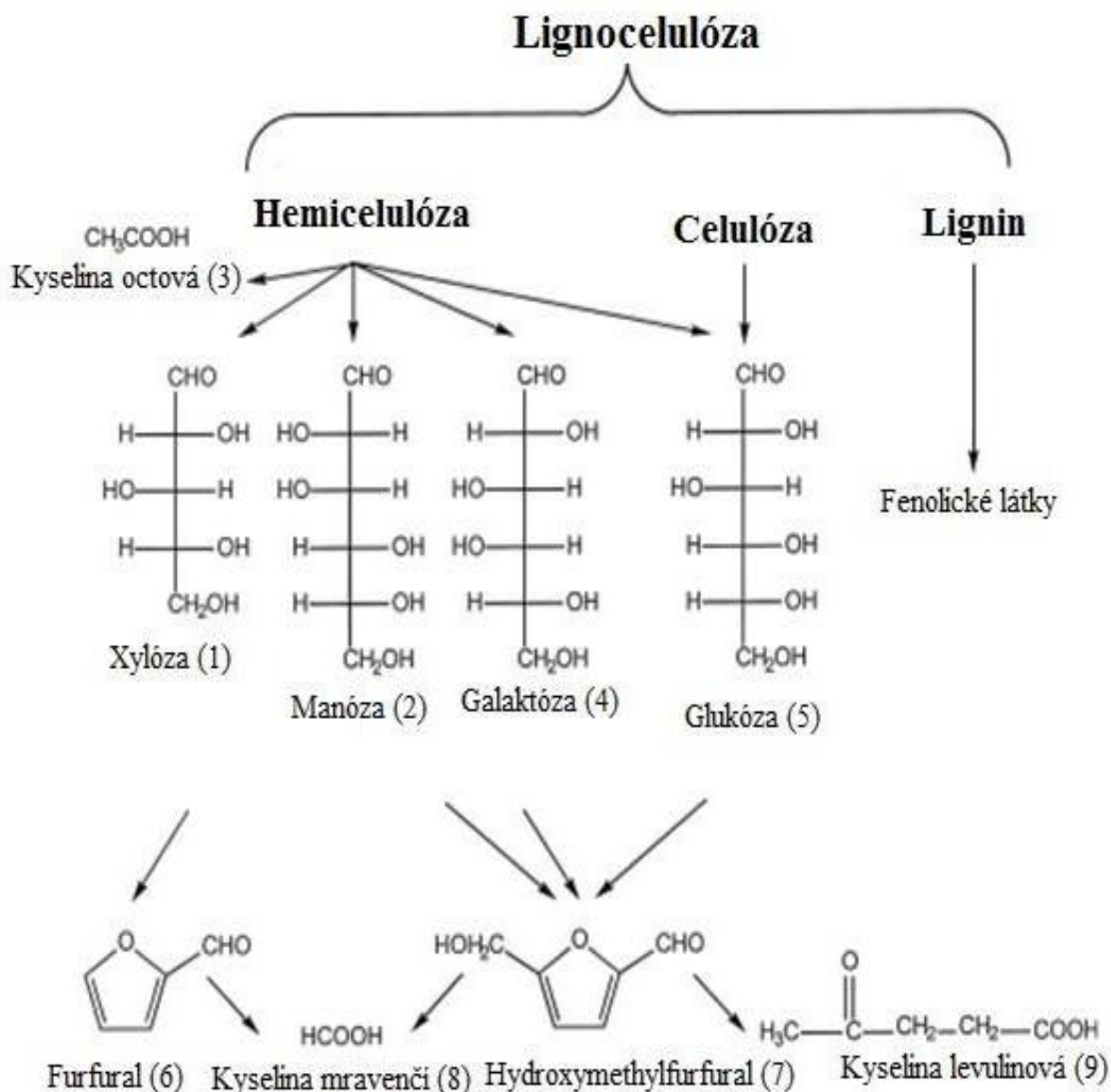
Biologické předúpravy lignocelulózy mohou být provedeny za použití mikroorganismů, zejména plísní, jako jsou například bílé plísně, hnědé plísně a měkké plísně, které se používají k degradaci ligninu a solubilizaci hemicelulózy. Bílé plísně jsou pro biologicky předběžné zpracování lignocelulózových materiálů neúčinnější. Tento druh úpravy mění strukturu ligninu a celulózy a odděluje je od lignocelulózové matrice. Hnědé plísně napadají celulózu, zatímco bílé a měkké plísně jak celulózu, tak i lignin. K odbourávání ligninu dochází během biologické předúpravy biomasy prostřednictvím působení enzymů vylučované houbami. Ačkoli biologické metody vyžadují mírné podmínky a nízké náklady pro zpracování, jejich nevýhodami je pomalá hydrolýza a delší doba pro předběžnou úpravu ve srovnání s jinými technologiemi. Současným trendem je právě kombinovat tuto technologii s dalšími metodami a vyvíjet nové mikroorganismy pro rychlejší hydrolýzy. [1],[7]

### **2.3 Hydrolýza lignocelulózových materiálů**

Hydrolýza je chemická reakce, při které jsou molekuly, přidáním molekuly vody a vhodného katalyzátoru, rozštěpeny. Katalýza může být zásaditá anebo kyselá. Při každém kroku hydrolýzy je spotřebovaná jedna molekula vody. V průběhu hydrolýzy vzniká vodíkový kationt, hydroxylový aniont a fragmenty původní molekuly. [9]



Prostřednictvím procesu nazývaného chemická hydrolýza, je možné převést celulózu a především hemicelulózu na zkvasitelné cukry. Ve většině případů, jsou získány dvě frakce. Jednou z frakcí jsou ve vodě nerozpustné pevné látky obsahující hlavně celulózu a lignin, a druhá kapalná frakce obsahuje hemicelulózu. Na základě předúpravy, hemicelulóza může být buď téměř úplně hydrolyzovaná na monomerní cukry anebo převedena na oligosacharidy. Dominantními cukry hemicelulóz jsou manóza (měkké dřevo) a xylóza (tvrdé dřevo), dále s malým množstvím arabinózy a galaktózy. I malá část celulózy může být převedena na glukózu, kdy většina tohoto nezreagovaného sacharidu zůstane a vyžaduje další hydrolýzu. [7]



Obrázek 6: Reakce probíhající během hydrolýzy lignocelulóзовých materiálů [10]

### 2.3.1 Kyselá hydrolýza

Kyselá hydrolýza může být provedena pomocí dvou přístupů. Zředěnou kyselinou při vysoké teplotě a tlaku s krátkou reakční dobou v rozmezí několika sekund až minut nebo koncentrovanou kyselinou při nízké teplotě. [7]



Hlavními problémy kyselé hydrolyzy jsou buď požadavky na eliminaci anebo na neutralizaci kyselin, která se provádí před fermentací a vzniká tak velké množství odpadů. Převážně kyselina sírová ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) se používá pro kyselou hydrolyzu, ačkoli je teoreticky možné použít i jiné anorganické kyseliny, jako je kyselina chlorovodíková ( $\text{HCl}$ ), kyselina dusičná ( $\text{HNO}_3$ ), trifluoroctová kyselina (TFA) a kyselina fosforečná ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). [7]

Hydrolyza zředěnými kyselinami se obvykle aplikuje za účelem hydrolyzy hemicelulózy a jako způsob předběžného zpracování celulózy k lepšímu přístupu pro enzymy. Nicméně, oba polysacharidy mohou být hydrolyzovány zředěnou kyselinou, což však vyžaduje dvoustupňový proces. Přičemž první stupeň se provádí za nízké teploty, aby se co nejvíce zvýšila přeměna hemicelulózy. Jako hemicelulózová frakce biomasy je depolymerovaná při nižší teplotě než je celulózová část a to kvůli strukturálním rozdílům mezi těmito dvěma uhlovodíkovými polymery. Na druhé straně, druhý stupeň způsobuje přeměnu celulózy na glukózu při vysokých teplotách (230 - 240 °C). Mezi hlavní nevýhody hydrolyzy pomocí kyseliny patří požadavek na vysokou teplotou, kde vzniká vysoké riziko produkce inhibitorů při degradaci cukrů. [7]

### 2.3.2 Enzymatická hydrolyza

Enzymatická hydrolyza lignocelulóзовé biomasy se obvykle provádí buď pomocí enzymů produkovaných mikroorganismy při svém růstu v médiích anebo pomocí komerčně dostupných enzymových systémů, jež jsou široce využívány. Enzymatická hydrolyza je považována za velmi příznivý a efektivní proces a to kvůli enzymové specifitě k substrátu, relativně nízkým teplotám během procesu a vytvoření minimálního množství inhibitorů. Hlavními enzymovými systémy používanými při hydrolyze lignocelulóзовé biomasy patří celulózy, hemicelulózy (xylanázy) a lignin degradující enzymy. [7]

Celulózy jsou obvykle používány ve směsi enzymů, které společně působí na celulózu a přeměňují ji na glukózu. Alespoň tři enzymy jsou potřebné v typickém celulózovém systému pro biokonverzi celulózy na glukózu, a to jsou endo- $\beta$ -1,4-glukanáza, exo- $\beta$ -1,4-glukanáza a  $\beta$ -glukosidáza. Endoglukanáza náhodně štěpí  $\beta$ -1,4-glykosidické vazby D-glukanových řetězců v amorfních oblastech molekuly celulózy a produkuje volné řetězce, které obsahují redukující i neredukující konce. Celobiohydrolyza pak působí na redukující a neredukující konce a štěpí je na celobiózu.  $\beta$ -glukosidáza pak převede celobiózu na glukózu. [7]

Účinný celulózový systém by měl být schopen degradovat krystalickou celulózu, snášet kyselé prostředí a stresové podmínky. Na rozdíl od celulózy, hemicelulóza (xylan) je chemicky složitější a její degradace vyžaduje specifitější enzymové systémy. Typický hemicelulózový systém zahrnuje endo- $\beta$ -1,4-xylanázu (endoxylanázu), xylan- $\beta$ -1,4-esterázu,  $\alpha$ -1-arabinofuranosidázu,  $\alpha$ -glukuronidázu,  $\alpha$ -arabinofuranosidázu, acetylxylanesterázu a  $\alpha$ -4-O-methyl glukuronoxylósidázu. Endoxylanázy štěpí hlavní řetězec xylanu a  $\beta$ -xylanesterázy napadají xylooligosacharidy na xylózu.  $\alpha$ -arabinofuranosidáza a  $\alpha$ -glukuronidáza působí na páteř xylanu a odstraňují arabinózu a 4-O-methyl-glukuronovou kyselinu. Acetylésterázy napadají acetylovou substituci xylozové zbytky, zatímco feruloylesterázy hydrolyzují esterové vazby a usnadňují uvolnění hemicelulózy z ligninu. [7]

Vzhledem ke strukturní složitosti ligninu, několik oxidačních enzymů vyžaduje spolupráci s celulózou a hemicelulózou za účelem rozložit fyzikální bariéru v lignocelulózovém komplexu. Tato akce způsobí snadný přístup hydrolytických enzymů do celulózových a hemicelulózových polysacharidů. Hlavními enzymy degradace ligninu je ligninperoxidáza, manganové peroxidázy a lakázy. Přeměna lignocelulóзовé biomasy na zkvasitelné cukry závisí na podmínkách hydrolyzy a typu biomasy. [7]

## 2.4 Detoxifikace hydrolyzátů

Dekontaminace hydrolyzátů má významný vliv na celkový proces a to kvůli hromadění vedlejších produktů odvozených od lignocelulózy. Ty působí jako inhibitory enzymů a zabráňují mikroorganismům fermentovat sacharidy z hydrolyzátů. Detoxifikace je tedy proces, kdy dochází k odstranění těchto inhibičních látek z hydrolyzátů a tím by měla být zabezpečena vyšší fermentační účinnost. Inhibitory lze rozdělit do tří hlavních skupin podle jejich původu, jako jsou alifatické kyseliny, furanové deriváty a fenolické sloučeniny. Pomocí detoxikace by měly být selektivně odstraněny inhibitory a také by měla být tato metoda levná a snadno implementovatelná do procesu. V současné době existuje mnoho detoxifikačních metod (biologické, chemické, fyzikální), které byly navrženy tak, aby došlo k přeměně inhibitorů na biologicky neaktivní sloučeniny, anebo ke snížení jejich koncentrace. Účinnost metody závisí na typu lignocelulóзовého hydrolyzátu a na druhu použitého mikroorganismu a to z toho důvodu, protože každý druh hydrolyzátu má jiný stupeň toxicity a každý druh mikroorganismu má jinou míru tolerance vůči inhibitorům. Před výběrem metody detoxifikace se musí brát ohled na složení hydrolyzátu, jež se mění v závislosti na substrátu a podmínkách hydrolyzy. [7],[11],[12]

### 2.4.1 Biologické detoxifikační metody

Biologické metody detoxifikace zahrnují použití specifických enzymů anebo mikroorganismů, které působí na toxické látky přítomné v hydrolyzátech a mění jejich složení. Na detoxifikaci lignocelulóзовých hydrolyzátů se využívají peroxidáza a lakáza, které působí na fenolové kyseliny a fenolové monomery. Tyto enzymy jsou nejčastěji získány z houby *Trametes versicolor*. Mechanismus detoxifikace těchto enzymů pravděpodobně zahrnuje oxidační polymeraci fenolických sloučenin s nízkou molekulovou hmotností. Použití mikroorganismů na detoxifikaci bylo také navrženo tak, aby došlo k selektivnímu odstranění inhibitorů z hydrolyzátů. Například k odstranění kyseliny octové z hydrolyzátu byl použit geneticky modifikovaný druh *Saccharomyces cerevisiae*. [12],[13]

### 2.4.2 Fyzikální detoxifikační metody

Jednou z nejvyužívanějších fyzikálních detoxifikačních metod je zakoncentrování hydrolyzátu pomocí vakuového odpařování, čímž dojde ke snížení obsahu těkavých látek jako je kyselina octová, furfural a jiné. Tato metoda však mírně snižuje koncentraci netěkavých toxických látek a tím zvyšuje i stupeň inhibice. Další metodou detoxifikace je použití aktivního uhlí, kdy dochází k odstranění inhibičních látek z roztoku adsorpcí. Účinnost této metody závisí na faktorech jako je pH, teplota, doba kontaktu aktivního uhlí s hydrolyzátem a samotná koncentrace aktivního uhlí. Sorpce inhibitoru na aktivní uhlí je velmi citlivá na změny pH. V případě, že rozpuštěné látky, které mají být odstraněny, jsou buď slabě kyselé (např. fenoly nebo karboxylové kyseliny), nebo slabě bazické (např. aminy), pak je hodnota pH hydrolyzátu ovlivněna adsorpcí. Slabé organické kyseliny jsou nejjednodušší adsorbovány v neionizovaném stavu, tedy ve stavu s nízkým pH. Například, fenoly jsou slabě kyselé a při nízkém pH, neutrální nebo neionizované fenolové molekuly jsou velmi snadno adsorbovány, zatímco při vysokých hodnotách pH, kdy fenoly jsou anionty, jsou adsorbovány hůře. Je tedy pravidlem, že organické kyseliny jsou nejlépe adsorbovány z roztoků kyselých a organické báze z roztoků zásaditých. [12]

### 2.4.3 Chemické detoxifikační metody

Chemické detoxifikační metody zahrnují srážení toxických látek a ionizaci některých inhibitorů při určitých hodnotách pH, čímž je možno dosáhnout minimálního stupně toxicity. Jednou z nejúčinnějších detoxifikačních metod je tzv. overliming. Jedná se vlastně

o detoxifikaci hydrolyzátů pomocí  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  na pH 9 až 10 a po detoxifikaci se pH upraví na hodnotu 5,5 pomocí kyseliny sírové. Také je pro tuto detoxifikaci často využíván i NaOH. Tímto procesem jsou částečně odstraněny fenolické sloučeniny a získáno určité množství xylitolu. Xylitol je přirozeně se vyskytující pětiuhlíkatý cukerný alkohol se sladkou chutí velmi podobnou sacharóze. Má téměř o třetinu nižší obsah kalorií a vzniká přeměnou xylanu. [12],[13],[14]

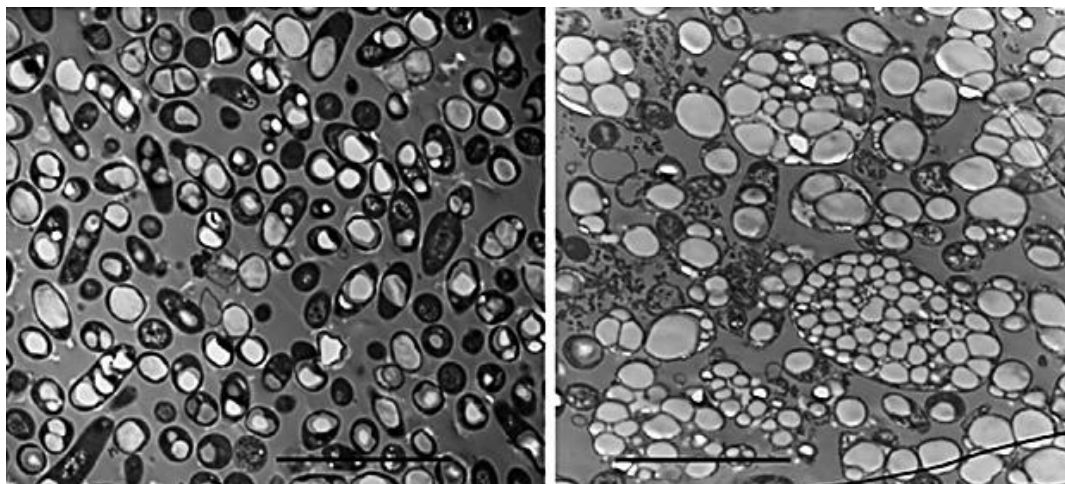
Také je možné k chemické detoxifikaci lignocelulózového hydrolyzáta použít borohydrát sodný, dithioničitan a hydrogensířičitan sodný, jež jsou silnými činidly detoxifikace. [15]

#### 2.4.4 Kombinace detoxifikačních metod

Detoxifikační metody můžeme mezi sebou kombinovat. Například je možné kombinovat chemické a fyzikální detoxifikační metody. V téhle kombinaci jsou použity kombinace bází ( $\text{CaO}$  nebo  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) a kyselin ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , nebo  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), které nám upravují počáteční hodnotu pH. Dále může být i nemusí k hydrolyzátu přidáno aktivní uhlí. Velmi dobrých výsledků bylo dosaženo, zvýšením hodnoty pH z 5,5 na 7,0  $\text{CaO}$  a poté snížením hodnoty na 5,5  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , dříve než bylo přidáno aktivní uhlí k hydrolyzátu. Na druhou stranu, zvýšením hodnoty pH v rozmezí od 5,5 do 7,0  $\text{CaO}$  a pak snížení na 5,5  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bez přidavku aktivního uhlí, byly výsledky z důvodu velmi malého množství vzniku xylitolu naopak horší. Můžeme také použít kombinaci  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  a  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pro počáteční úpravu hodnoty pH z 10,0 na 5,5, kdy po této pH úpravě je aktivní uhlí přidáno k hydrolyzátu, který je déle odpařen. Kombinace pH úpravy a aktivního uhlí je vhodná pro odstraňování derivátů ligninu, a to už z toho důvodu, že aktivní uhlí samo odstraní až 95,4 % těchto inhibitorů. [12]

#### 2.5 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA), jsou polyester syntetizovány a uloženy v bakteriálních buňkách ve formě intracelulárních granulí. Bakterie si ve formě PHA skladují zásoby uhlíku a energie. Protože jsou polyhydroxyalkanoáty mikrobiálním produktem, existuje mnoho přírodních enzymů, které dovedou tento polymer rozkládat. Jejich další výhodou je, že mohou být produkovány fermentací z obnovitelných surovin, jako je například rafinovaná glukóza nebo sacharóza, levné odpadní produkty ze zemědělství a také potravinářského průmyslu. Tím dochází ke snížení nákladů k produkci PHA. Jsou tedy považovány za velmi atraktivní náhrady ropných polymerů (např. polypropylen), protože se jim svými mechanickými vlastnostmi velmi podobají. [16],[17],[18],[19]



Obrázek 7: Snímek z elektronového mikroskopu, kdy bakterie *E. Coli* produkuje PHA [20]

### 2.5.1 Historie

Poprvé byly pozorovány v roce 1888 Beijerinckem, ale nedokázal určit jejich roli a složení. V roce 1926 francouzský vědecký pracovník Lemoigne získal z bakterie *Bacillus megaterium* poly-3-hydroxymáseľnou kyselinu (P3HB). V roce 1958 Macrae a Wilkinson dokázali, že PHA v bakteriálních buňkách hrají velmi významnou roli a to jako zdroj uhlíku a energie, a jsou shromažďovány pouze za zvýšeného poměru uhlíku s dusíkem. V současné době je trh s PHA velmi malý. Producenti PHA jsou ale optimističtí a stále vidí potenciál v těchto biomateriálech a tvrdí, že polyhydroxyalakanóáty jsou nová generace biopolymerů a jejich uvedení na trh potřebuje čas na vývoj. Odhaduje se, že poptávka po PHA poroste do roku 2020 až desetinásobně. [16]

### 2.5.2 Vlastnosti

Polyhydroxyalakanóáty v posledních letech přitáhly velkou pozornost a to vzhledem k jejich podobným vlastnostem s petrochemickými polymery jako je polypropylen nebo polystyren. Vlastnosti PHA jsou závislé na bakteriálním producentovi daného biopolymeru a fermentačních podmínkách použitých k jejich výrobě. [16]



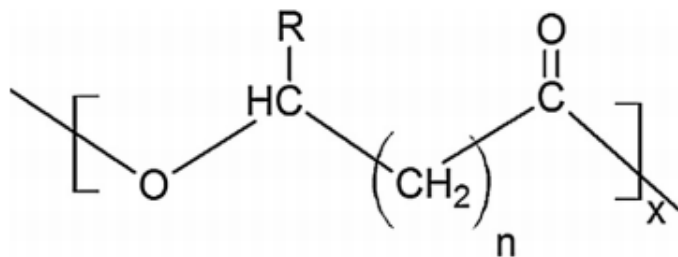
Obrázek 8: Rozpad PHA lahve po několika týdnech [21]

### 2.5.3 Chemická struktura

Polyhydroxyalakanóáty slouží jako ve vodě nerozpustné sloučeniny, jež jsou syntetizované mikroorganismy v podobě tzv. granulí v době stresových podmínek okolního prostředí. Je-li externí zdroj uhlíku vyčerpán, shromážděné biopolymery jsou depolymerovány a jejich degradační produkty mohou být použity jako zdroj uhlíku a energie. [16]

Polyhydroxyalakanóáty je třída lineárních polyesterů skládající se z monomerů hydroxykyselin spojených esterovou vazbou. Tato vazba vzniká připojením karboxylové skupiny jednoho monomeru k hydroxylové skupině sousedního monomeru. V závislosti na počtu atomů uhlíku v monomerech, jsou polyhydroxyalakanóáty rozděleny do dvou skupin: délka PHA s krátkým řetězcem (scl-PHA) s 3 - 5 atomy uhlíku v každé monomerní jednotce a se středně dlouhým řetězcem (mcl-PHA) s 6 - 14 atomy uhlíku v každé jednotce. [16],[17]

Mnohé bakterie jsou schopny vytvářet různé polyhydroxyalkanoátové biopolyestery. Polyhydroxyalkanoátová struktura zahrnuje různé druhy PHA, jako jsou např. homopolymery, statistické kopolymery a také blokové kopolymery. [21]



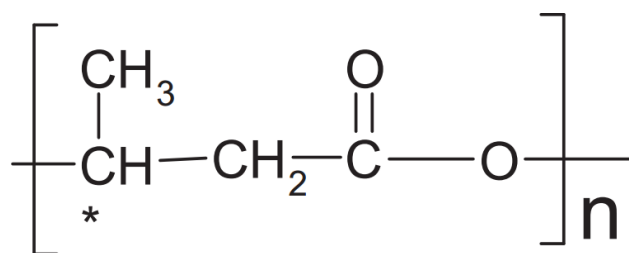
Obrázek 9: Obecná struktura PHA [16]

## 2.5.4 Druhy PHA

V rámci jedné konkrétní metabolické dráhy je zcela intracelulárně realizovaná syntéza polyhydroxyalkanoátů. PHA jsou velmi materiálově významné a to proto, že je známo více než 150 variant monomerů. Mezi nejznámější monomery patří 3-hydroxybutyrát (3HB) a 3-hydroxyvalerát (3HV) a dále jsou to 3-hydroxyhexanoát (3HHx), 3-hydroxyoktanoát (3HO), 3-hydroxydekanoát (3HD), 3-hydroxydodekanoát (3HDD), stejně jako 4-hydroxybutyrát (4HB). Z těchto monomerních druhů mohou být vytvořeny různé typy polymerů, které vedou k velké rozmanitosti vlastností materiálů. [22]

### 2.5.4.1 Polyhydroxybutyrát (PHB)

Homopolymer poly-3-hydroxybutyrát (P3HB) je nejběžnějším polyhydroxyalkanoátem a patří do homologické řady alifatických polyesterů. Je částečně krystalický a biologicky odbouratelný. Vzniká biologickou kondenzací hydroxybutyryl-CoA a je syntetizován různými kmeny bakterií, jako je např. *Cupriavidus necator* H16. Vzhledem k jeho vynikajícím termoplastickým vlastnostem je využíván v plastikářském průmyslu. Polyhydroxybutyrát je netoxický a je zřejmé, že je organismy tolerován i v poměrně vysokých koncentracích. Tento polymer je bakteriemi, které žijí v půdě nebo odpadních vodách, pomalu rozkládán na vodu a oxid uhličitý, a to zejména za anaerobních podmínek. [23]

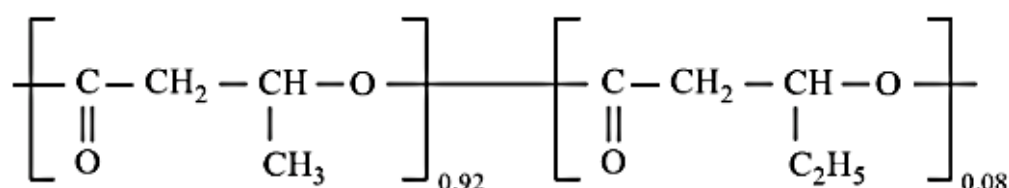


Obrázek 10: Chemický vzorec PHB [23]

### 2.5.4.2 PHB-PHV

Kopolymer poly(-3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) [P(3HB-co-3HV)] obsahuje dva monomery; kyselinu hydroxymáselnou a 3-hydroxyvalerát. Z toho důvodu, že tento polymer obsahuje monomer 3-hydroxyvalerát, jsou důkladně testovány jeho toxikologické vlastnosti. Kromě toho, podíl 3-hydroxyvalerátu v kopolymeru P(HB-co-HV) může být řízen v závislosti na koncentraci použitého prekurzoru. Má výborné mechanické vlastnosti, jako je tuhost, pružnost, odolnost proti nárazu, kterými se od ostatních polyhydroxyalkanoátů liší. [24],[25],[26]

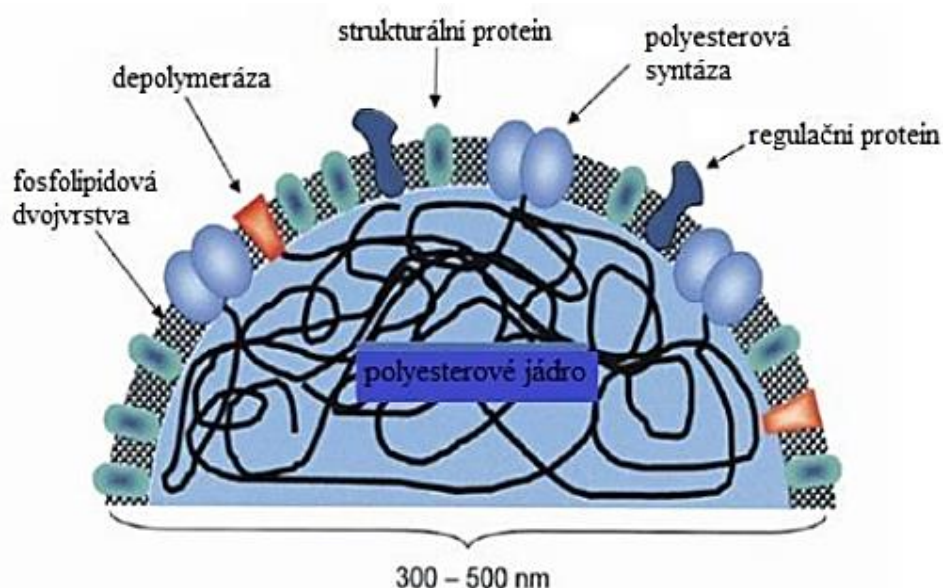




Obrázek 11: Chemický vzorec PHBV [27]

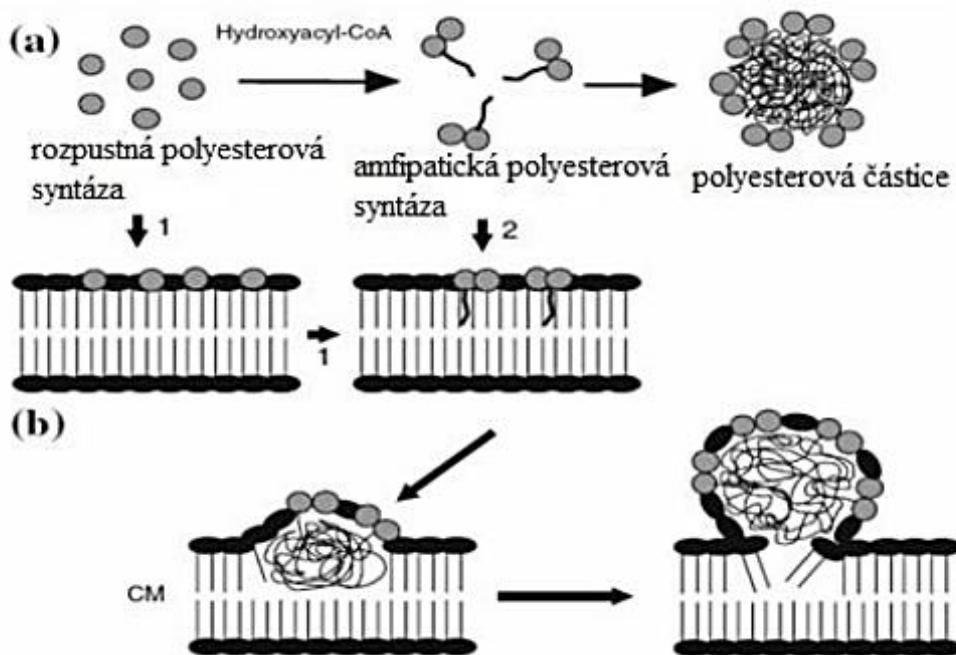
### 2.5.5 Struktura intracelulárních granulí PHA

Polyhydroxyalkanoáty se hromadí v mikrobiálních buňkách ve formě intracelulárních granulí - zrn. Polyester se v buňkách vyskytuje v metastabilním amorfním stavu, což bylo jasně prokázáno nukleární magnetické rezonancí (NMR). Izolované granule se skládají z polyesterů, proteinů a fosfolipidů. PHB granule bakterie *Bacillus megaterium* obsahují 97,7 % polyesteru, 1,87 % bílkovin a 0,46 % tuků nebo fosfolipidů. V polyhydroxyalkanoátových granulích je materiál polyesteru obklopen fosfolipidovou dvouvrstvou, ve které jsou obsaženy proteiny. Fosfolipidy s proteiny, které představují rozhraní mezi vrstvou PHA a cytoplazmou, jsou přítomny v buňce kvůli silnému hydrofobnímu charakteru PHA. Ve fosfolipidové dvouvrstvě jsou usazeny granule spojené s proteiny, nazývané také jako phasiny. Phasiny jsou proteiny s nízkou molekulovou hmotností. Je předpokládáno, že tyto molekuly na povrchu granulí umí vytvořit velmi tenkou proteinovou vrstvu. Kromě toho, se phasiny pravděpodobně podílejí na regulaci PHA syntézy, ale mechanismus nebyl doposud jasně vysvětlen. [28]



Obrázek 12: Struktura polyhydroxyalkanoátové granule [28]

V pokusech *in vitro* bylo prokázáno, že pro samspořádání granulí a syntézu PHB jsou potřeba pouze substrát a PHA syntázy. Na druhou stranu, biosyntéza PHA granulí *in vivo* je popsána dvěma modely. Tzv. micelární model, který je první z nich, je založen na pozorování PHA syntézy *in vitro*, zatímco druhý tzv. rodící - pučící model, je založen na pozorování membrány obklopující PHA granule. Ty jsou ale naopak umístěny v těsné blízkosti membrány a ne náhodně rozptýleny v cytoplazmě, jak by se dalo předpokládat. [28]

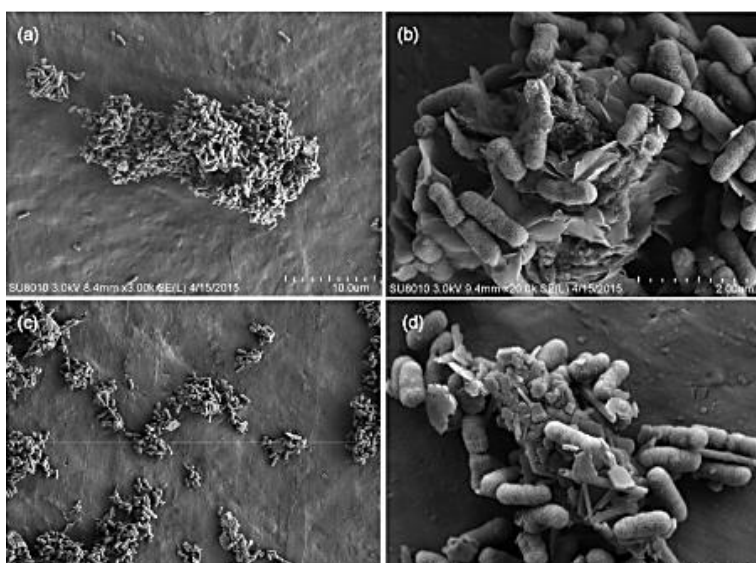


Obrázek 13: Modely pro polyesterové granulové uspořádání, a) in vitro b) in vivo shromáždění a její dvě možné cesty [28]

## 2.5.6 Mikroorganismy produkující PHA

### 2.5.6.1 *Burkholderia cepacia*

*Burkholderia cepacia*, dříve *Pseudomonas cepacia*, je gramnegativní bakterie široce rozšířena v oblasti přírodních a umělých stanovišť. Je izolovatelná z půdy, rostlin a také z vod. Tyto bakterie vykazují mimořádnou metabolickou univerzálnost, což umožňuje jejich přizpůsobení se k široké řadě prostředí. Byla objevena v roce 1980 jako život ohrožující a obtížně léčitelný patogen u pacientů s cystickou fibrózou. Jedná se o aerobní, multirezistentní bakterie, které jsou schopny přežít i v přítomnosti dezinfekčních prostředků. [29]



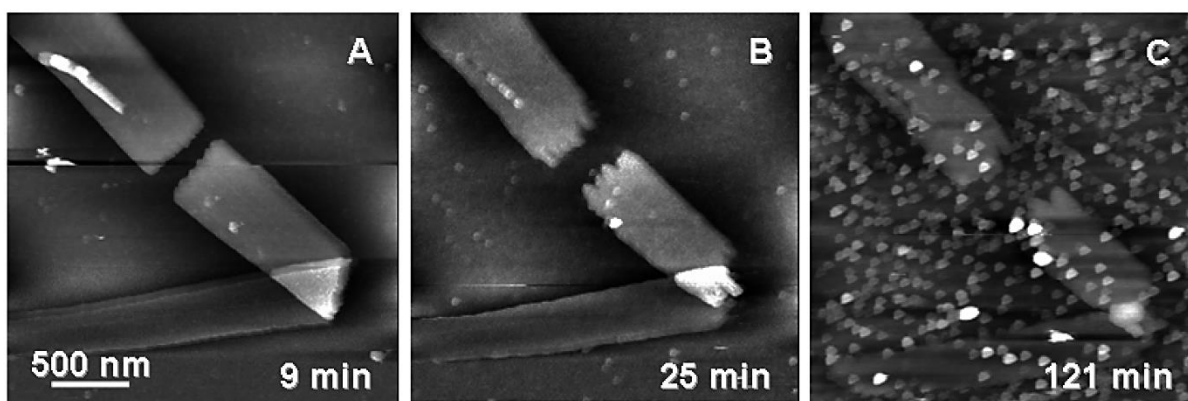
Obrázek 14: *Burkholderia cepacia* [30]

### 2.5.6.2 *Burkholderia sacchari*

*Burkholderia sacchari*, gramnegativní bakterie izolovatelná z půdy v Brazílii, je popsána jako nový druh. Tuto bakterii je možné využít k výrobě polyhydroxyalkanoátů, konkrétně tedy kopolymeru P(3HB-co-4HB) po přidavku odpovídajícího prekursoru. Tento kmen byl izolován z plantáží cukrové třtiny, a bylo prokázáno, že je schopen akumulovat také homopolymer P(3HB) jak z hexóz, tak i z pentóz. [31],[32]

### 2.5.7 Biodegradace PHA

V současné době se polyesterů využívají v nejrůznějších oblastech průmyslu, zatímco nakládání s plastovými odpady se nedávno stalo kritickým globálním problémem. Jak už bylo řečeno, jednou z unikátních vlastností polyhydroxyalkanoátových materiálů je jejich biologická rozložitelnost v přirozeném prostředí. Polyhydroxyalkanoát je pevný polymer s vysokou molekulovou hmotností, tudíž nemůže být transportován skrz buněčnou stěnu. Mikroorganismy vylučují extracelulární PHA-degradující enzymy (PHA depolymerázy), které umí hydrolyzovat PHA na ve vodě rozpustný monomer či oligomer. Tyto degradační produkty s nízkou molekulovou hmotností mohou být pak transportovány do buněk a následně metabolizovány za vzniku uhlíku a energie. [33]



Obrázek 15: Adsorpce a počáteční degradace PHB monokrystalů PHA depolymerázou [33]

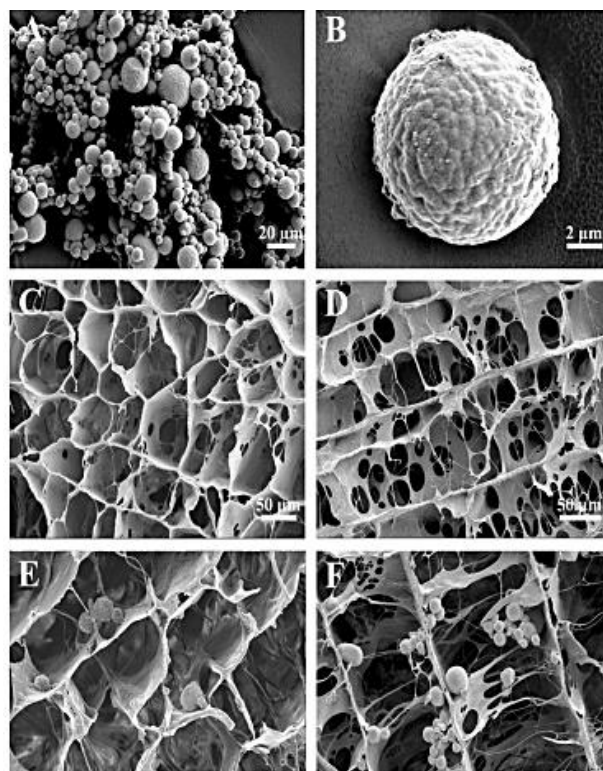
### 2.5.8 Využití polyhydroxyalkanoátů

Vzhledem k jejich univerzálnosti jsou velmi dobrými kandidáty v téměř všech možných oblastech využití. Dají se využít jak v potravinářském průmyslu jako obalovací materiál, textilním průmyslu tak i v lékařství. Dřívější aplikace byly hlavně v oblasti balení – plastové tašky, kontejnery a potahy papíru. Nedávno byla pozornost zaměřena na lékařské aplikace vzhledem k jeho žádoucí biologické odbouratelnosti a bezpečnosti jako vstřebatelný materiál (šicí stehy). V oblasti tkáňového inženýrství se využívají jako tzv. skafoldy (lešení) a systémy k podávání léků. [34]

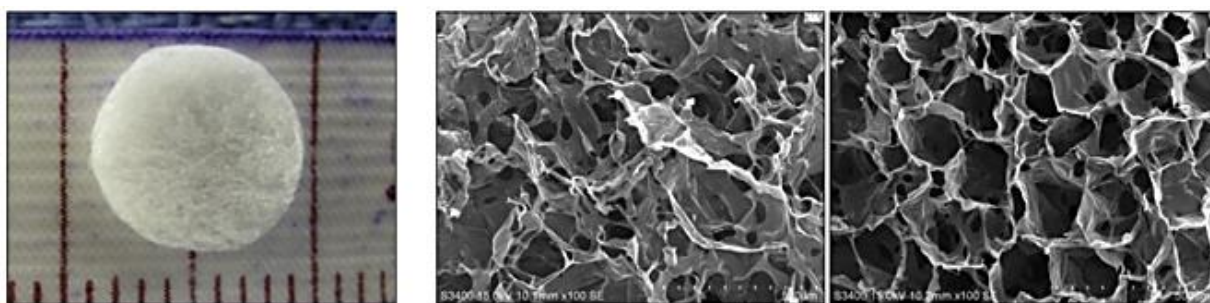
#### 2.5.8.1 Skafoldy v tkáňovém inženýrství

Tkáňové inženýrství je multidisciplinární obor kombinující biologii, materiálovou vědu a chirurgickou rekonstrukci. Poskytuje živé tkáňové produkty, které umí obnovit, zachovat, nebo zlepšit jejich funkci. Skafoldy zajišťují živým buňkám přilnavost, podporují jejich růst, řídí a organizují je požadovaným způsobem. Poté, co se vytvoří nová náhradní tkáň, skafoldy degradují bez jakéhokoliv toxického uvolnění. V současné době se používá mnoho typů PHA jako náhrada kožní tkáně, podkožní tkáně, kardiovaskulární tkáně, srdeční chlopně, nervové tkáně, jícnu, chrupavky i kostní tkáně. [34]





Obrázek 16: Chitosan-kolagenový skafold [35]



Obrázek 17: Kolagenový skafold [35]

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Použité chemikálie, přístroje a mikroorganismy

##### 3.1.1 Použité mikroorganismy

V experimentální části byly použity bakterie *Burkholderia cepacia* CCM 2656 z České sbírky mikroorganismů Masarykovy University v Brně a *Burkholderia sacchari* DSM 17165 z Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Také byla použita kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* ze sbírky CCY v Bratislavě.

##### 3.1.2 Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů

Nutrient Broth, Himedia  
Agar powder, Himedia  
Beef extract, Himedia  
Yeast extract, Himedia  
Proteose Peptone, Himedia  
Glucose, Lachema  
Casamino Acids, SIGMA - ALDRICH  
Soluble Starch, SIGMA - ALDRICH  
Pyruvát sodný, Lachema

##### 3.1.3 Standardní chemikálie

Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid], Fluka  
Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalérát) (12% 3HV), Fluka

##### 3.1.4 Ostatní chemikálie

Dihydrogenfosforečnan draselný,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , lach-ner  
Síran hořečnatý heptahydrát,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , lach-ner  
Síran amonný,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , lach-ner  
Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , lach-ner  
Hydroxid sodný,  $\text{NaOH}$ , lach-ner  
Kyselina sírová 96%,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , lach-ner  
Uhličitan sodný,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , lach-ner  
Ethanol,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , lach-ner  
Hydroxid vápenatý,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , lach-ner  
Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Penta  
3,5-dinitrosalicylová kyselina, SIGMA – ALDRICH  
Chlorid vápenatý dihydrátu,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Lachema  
Citronan amonno-železitý, Fluka  
Chloroform,  $\text{CHCl}_3$ , VWR Prolabo Chemicals  
Vínan sodno-draselný,  $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$ , Lachema  
Xylóza, SIGMA - ALDRICH  
Kyselina gallová, SIGMA - ALDRICH  
Kyselina octová, lach-ner  
Kyselina levulinová, GFBiochemicals  
Folin-Ciocalteovo činidlo, VWR Prolabo Chemicals

##### 3.1.5 Použité přístroje

Plynový chromatograf:  
Trace GC Ultra FID detector, Finnigan, Thermo  
Kolona – DB-WAX 30 m by 0,25 mm pro stanovení

Iontový chromatograf:  
Metrohm 850 Professional IC 1  
Kolona – Metrosep Organic Acids 250/7.8  
Ostatní přístroje:  
pH metr Sensodirect 200, Lovibond  
pH Testr, Thermo Scientific Eutech  
Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments  
Nanophotometr Pearl, Implen  
Předvážky EW 620, Kern  
Analytické váhy BAS 31, Boeco Germany  
Centrifuga U-32R, Boeco Germany  
Vortex TK3S, techno Kartell  
Bioreaktor s příslušenstvím, VWR Hotplate/Stirrer  
Magnetická míchačka, techno Kartell  
Termostat blokový SBH-200D, Stuart  
Vodní lázeň TW2, Julabo  
Biologický inkubátor IP100-U, Scientific  
Třepačka Helidolphunimax 1000, inkubátor Helidolphunimax 1010, Labcom s.r.o.  
Běžné laboratorní sklo a vybavení

### **3.2 Příprava roztoků**

#### **3.2.1 Roztok 3,5-dinitrosalicylové kyseliny pro stanovení redukujících sacharidů**

Bylo naváženo 2 g 3,5-dinitrosalicylové kyseliny, 60 g vianu sodnodraselného. Kyselina 3,5- dinitrosalicylová byla rozpuštěna zahřátím ve 100 ml destilované vody a 40 ml 2M NaOH. Na přípravu 2M NaOH bylo naváženo 8 g NaOH a rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. Po rozpuštění 3,5-dinitrosalicylové kyseliny bylo do roztoku přidáno 60 g vianu sodnodraselného a objem roztoku byl doplněn destilovanou vodou na 200 ml.

### **3.3 Příprava modelového a reálného hydrolyzátu lignocelulózy**

#### **3.3.1 Modelový hydrolyzát**

Složení modelového hydrolyzátu:

- |                       |         |
|-----------------------|---------|
| • Glukóza             | 5 g     |
| • Xylóza              | 10 g    |
| • Kyselina gallová    | 1,5 g   |
| • Kyselina octová     | 0,5 g   |
| • Kyselina levulinová | 0,5 g   |
| • Destilovaná voda    | 1000 ml |

#### **3.3.2 Chemická hydrolýza dřevěných pilin**

Dřevěné piliny o koncentraci 50 g/l byly hydrolyzovány v 500 ml Erlenmayerových baňkách pomocí 2 % kyseliny sírové. Piliny byly odváženy na analytických vahách a následně kvůli lepšímu průběhu hydrolýzy byly spolu s 2% kyselinou sírovou umístěny do tlakového hrnce po dobu 60 minut. Po uplynutí jedné hodiny byly hydrolyzáty zchladnuty a zneutralizovány pomocí NaOH na pH přibližně 5 a zfiltrány za sníženého tlaku. V získaných hydrolyzátech byl stanoven obsah redukujících sacharidů pomocí 3,5-dinitrosalicylové kyseliny a polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteova činidla.

### **3.4 Stanovení koncentrace redukujících sacharidů pomocí 3,5-dinitrosalicylové kyseliny**

Do zkumavek bylo napipetováno 0,1 ml vzorku, 0,4 ml destilované vody (vzorek byl tak zředěn 5krát) a 0,5 ml činidla 3,5-dinitrosalicylové kyseliny. Poté byly vzorky zahřívány na vodní lázni při 70 °C po dobu 10 minut. Vzorky byly poté ponechány ve tmě vychladnout. Následně byly všechny zkumavky doplněné destilovanou vodou na objem 10 ml a důkladně promíchány. Vzorky byly pomocí spektrometru při vlnové délce 540 nm analyzovány. Slepý vzorek - blank byl současně připravován s ostatními vzorkami, kde bylo pipetováno 0,5 ml činidla. Po vyjmutí z vodní lázně (70 °C po dobu 10 minut) a následném vychladnutí bylo přidáno 9,5 ml destilované vody, tedy doplněno na objem 10 ml. Pomocí rovnice kalibrační křivky sestavené pro dané koncentrace glukózy bylo vypočítáno množství sacharidů ve vzorku. Každý vzorek byl analyzován třikrát, byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka z naměřených dat pomocí software Microsoft Office Excel.

#### **3.4.1 Stanovení kalibrační přímky**

Pro stanovení kalibrační křivky byl připraven roztok glukózy o koncentraci 5 g/l. Do připravených zkumavek bylo poté odpipetováno 3,0; 2,7; 2,4; 2,1; 1,8; 1,5; 1,2; 0,9; 0,6; 0,3; 0,1 ml tohoto roztoku. Zkumavky byly doplněny destilovanou vodou na objem 3 ml. Dále bylo odpipetováno 0,5 ml těchto připravených roztoků a k nim přidáno 0,5 ml činidla 3,5-dinitrosalicylové kyseliny. Zkumavky byly umístěny na 10 minut do vodní lázně při 70 °C. Poté byly ponechány ve tmě zchladnout a byly doplněny destilovanou vodou na 10 ml. Byla změřena absorbance spektrofotometricky při 540 nm.

### **3.5 Stanovení celkových polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteovi metody**

Při reakci polyfenolů a Folin-Ciocalteova činidla vzniká modrý komplex. Do zkumavky byl napipetován 1 ml desetkrát zředěného Folin-Ciocalteova činidla, 1 ml destilované vody a 50 µl vzorku. Směs byla promíchána a ponechána po dobu 5 minut stát. Potom byl k roztoku přidán 1 ml nasyceného Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Po 15 minutách byla změřena absorbance při 750 nm. Každý vzorek byl analyzován dvakrát a ze získaných dat byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka pomocí software Microsoft Office Excel. Koncentrace polyfenolů ve vzorcích byla vypočítána z rovnice grafu závislosti absorbance na koncentraci standardu, kterým byla kyselina gallová.

#### **3.5.1 Stanovení kalibrační přímky**

Na analytických vahách bylo naváženo 0,05 g kyseliny gallové. Navážka této kyseliny byla rozpuštěna a převedena do 50 ml odměrné baňky a doplněna destilovanou vodou po značku. Do pěti 10 ml odměrných baněk bylo napipetováno 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 a 2,0 ml připraveného roztoku kyseliny gallové a odměrné baňky byly doplněny destilovanou vodou po značku. Tímto byla vytvořena kalibrační řada roztoků o koncentracích 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 a 200,0 mg/l. Do zkumavky byl přidán 1 ml desetkrát zředěného Folin-Ciocalteova činidla, 1 ml destilované vody a 50 µl vzorku. Obsah zkumavek byl promíchán a po 5 minutách byl přidán 1 ml nasyceného roztoku Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Po 15 minutách byla změřena absorbance vzorků při 750 nm.

### **3.6 Stanovení koncentrace organických kyselin pomocí iontové chromatografie**

V získaných supernatantech byla stanovena koncentrace organických kyselin. Vzorky byly analyzovány pomocí iontové chromatografie s vodivostním detektorem s následujícími podmínkami: teplota 30 °C, tlak 5,16 MPa a průtok mobilní fáze 0,600 ml/min.

### 3.7 Stanovení PHA pomocí plynové chromatografie (GC)

Principem metody je převedení polyhydroxyalkanoátů pomocí esterifikace na těkavé methylester- $\beta$ -hydroxykarboxylové kyseliny.

#### 3.7.1 Stanovení kalibrační křivky PHA

Roztok dostupného PHA (standard P3HB nebo P(3HB-co-3HV) o koncentraci 10 mg/ml byl napipetován do vialek v množstvích 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1,0 ml. Vzorek byl doplněn chloroformem na výsledný objem 1 ml a dále bylo přidáno 0,8 ml 15 % roztoku kyseliny sírové v methanolu. Vialky před vložením do termostatu při 100 °C na 3 hodiny byly uzavřeny víčkem. Po vychladnutí byl k celkovému objemu vialek přidán 0,5 ml 0,05 M roztoku NaOH. Po protřepání, došlo k oddělení fází. Bylo odpipetováno 0,05 ml spodní chloroformové fáze, která byla následně převedena spolu s 0,950 ml chloroformu do vialek. Vialky byly uzavřeny a analyzovány pomocí plynové chromatografie.

#### 3.7.2 Stanovení PHA v biomase

Do větších vialek bylo přibližně naváženo 10 mg biomasy. K biomase byl přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15 % roztoku kyseliny sírové v methanolu. Vialky, než byly pečlivě uzavřeny víčkem, byly umístěny do termostatu při 100 °C po dobu 3 hodin. Poté až byly vialky zchladnuty, byl jejich celkový objem převeden do větších vialek s 0,5 ml 0,05 mol/l roztoku NaOH. Po protřepání a oddělení fází bylo odpipetováno 0,05 ml spodní chloroformové vrstvy, která byla následně převedena spolu s 0,950 ml chloroformu do vialek. Vialky byly uzavřeny a analyzovány pomocí GC.

### 3.8 Gravimetrické stanovení biomasy v jednotlivých kultivacích

Bylo odebráno 10 ml vzorku do předem zvážených zkumavek. Zkumavky byly následně zcentrifugovány po dobu 5 minut při 8000 ot/min. Kapalná část byla odebrána pro stanovení redukujících sacharidů a polyfenolů pomocí spektrofotometrie. Poté byla biomasa promyta 5 ml destilované vody a spolu s ní rozsuspendována. Vzorky byly znovu zcentrifugovány při 8000 ot/min po dobu 5 minut. Kapalná část (supernatant) byla odlita a biomasa byla v sušárně sušena při 70 °C po dobu 24 hodin.

### 3.9 Detoxifikace hydrolyzátů

Byly použity čtyři metody na odstranění toxických látek pro mikroorganismy, jako jsou furfural, polyfenoly a jiné:

- Detoxifikace pomocí aktivního uhlí a lignitu, kde bylo k hydrolyzátům přidáno aktivní uhlí a lignit v koncentraci 1 g na 20 ml hydrolyzátu. Roztoky byly dále umístěny na třepačku při 55 °C po dobu 60 minut. Následně byly roztoky zfiltrvány za sníženého tlaku.
- Detoxifikace tzv. overlimingem, kde byl k hydrolyzátům přidáván  $\text{Ca(OH)}_2$  až do pH 10 a hydrolyzáty byly umístěny na třepačku při 55 °C po dobu 1 hodiny. Potom byly zfiltrvány za sníženého tlaku a filtrát byl zneutralizovaný  $\text{Ca(OH)}_2$  na pH 5,5.
- Detoxifikace odpařením, kde byly hydrolyzáty promíchávány po dobu 1 až 2 hodin při teplotě 80 °C. Tato detoxifikace slouží k odstranění prchavých látek z hydrolyzátu. Po detoxifikaci byl doplněn objem destilovanou vodou, který se odpařil.

### 3.10 Kultivace bakterií *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

#### 3.10.1 Příprava inokula pro mikroorganismy

Pro kultivaci inokula *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari* a *Saccharomyces cerevisiae* byla připravena tekutá živná média o objemu 50 ml do 100 ml Erlenmeyerových baněk. Připravená média byla sterilizována v tlakových hrncích po dobu 60 minut se zavřeným ventilem. Po vysterilizování a následném ochlazení byly v laminárním boxu pomocí bakteriologické kličky třikrát zaočkovány do Erlenmayerových baněk bakterie *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sacchari* a kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Připravená inokula byla kultivována na třepáčkách po dobu 24 hodin při teplotě 30 °C při 180 ot/min.

#### 3.10.2 Živná média

##### 3.10.2.1 Pro bakterie

Na přípravu inokula bakterie *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* bylo použito komerčně dostupné živné médium Nutrient Broth se složením:

- Beef extract 10 g
- Pepton 10 g
- NaCl 5 g
- Destilovaná voda 1000 ml

##### 3.10.2.2 Pro kvasinku

Na přípravu inokula kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* bylo použito médium YPD o složení:

- Yeast extract 10 g
- Pepton 20 g
- Glukóza 20 g
- Destilovaná voda 1000 ml

#### 3.10.3 Zaočkování bakterií a kvasinek

Připravená inokula byla přeočkována do minerálních médií a to z důvodu produkce polyhydroxyalkanoátů. Do 100 ml Erlenmayerových baněk bylo připraveno 25 ml minerálního média a k němu bylo následně přidáno 25 ml daného hydrolyzátu.

Složení produkčního minerálního média pro bakterie *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*:

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 g
- $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  9,02 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,2 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  0,1 g
- $\text{NH}_4\text{-Fe(III) citrát}$  0,06 g
- Roztok stopových prvků\* 1 ml

\*Roztok stopových prvků 1ml/1000ml

- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1g/l
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,03g/l
- $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,3g/l
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,2g/l
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,02g/l

$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02g/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,03 g/l

Složení produkčního minerálního média pro kvasinku *Saccharomyces cerevisiae*:

- Kvasničný extrakt 1 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,25 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,125 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,25 g
- Glukóza 25 g
- Destilovaná voda 250 ml

Erlenmayerovy baňky byly sterilizovány v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 60 minut.

Po sterilizaci a ochlazení bylo v laminárním boxu napipetováno 50  $\mu\text{l}$  TES do každého média a 5 ml inokula *Burkholderia cepacia* nebo *Burkholderia sacchari*. Do média pro kvasinku bylo napipetováno 6,25 ml glukózy a 5 ml inokula *Saccharomyces cerevisiae*. Připravené kultury byly při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin kultivovány na třepačkách.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

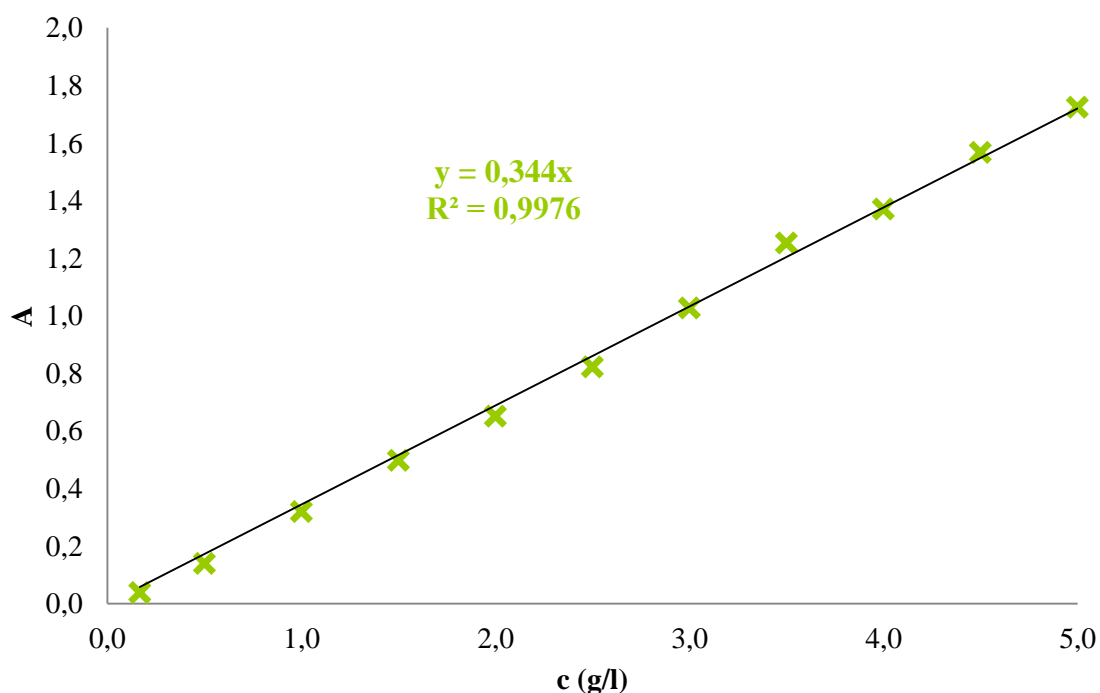
### 4.1 Kalibrace metod

#### 4.1.1 Kalibrace stanovení redukujících sacharidů pomocí 3,5-dinitrosalicylové kyseliny

Data pro stanovení kalibrační závislosti byla získána spektrofotometrickým měřením roztoků glukózy o různých koncentracích při vlnové délce 540 nm podle postupu v kapitole 3.4.1.

Tabulka 1: Závislost absorbance na koncentraci glukózy při vlnové délce 540 nm

Koncentrace glukózy $c$ (g/l)	Absorbance $A$ (540 nm)
0,17	0,038
0,50	0,139
1,00	0,319
1,50	0,497
2,00	0,651
2,50	0,822
3,00	1,027
3,50	1,253
4,00	1,370
4,50	1,567
5,00	1,724



Graf 1: Kalibrační závislost glukózy pro stanovení redukujících sacharidů při 540 nm

Ze závislosti absorbance na koncentraci byla stanovena kalibrační přímka  $y = 0,344x$ , která byla použita pro stanovení koncentrace redukujících sacharidů. Regresní koeficient  $R^2 = 0,9976$ .

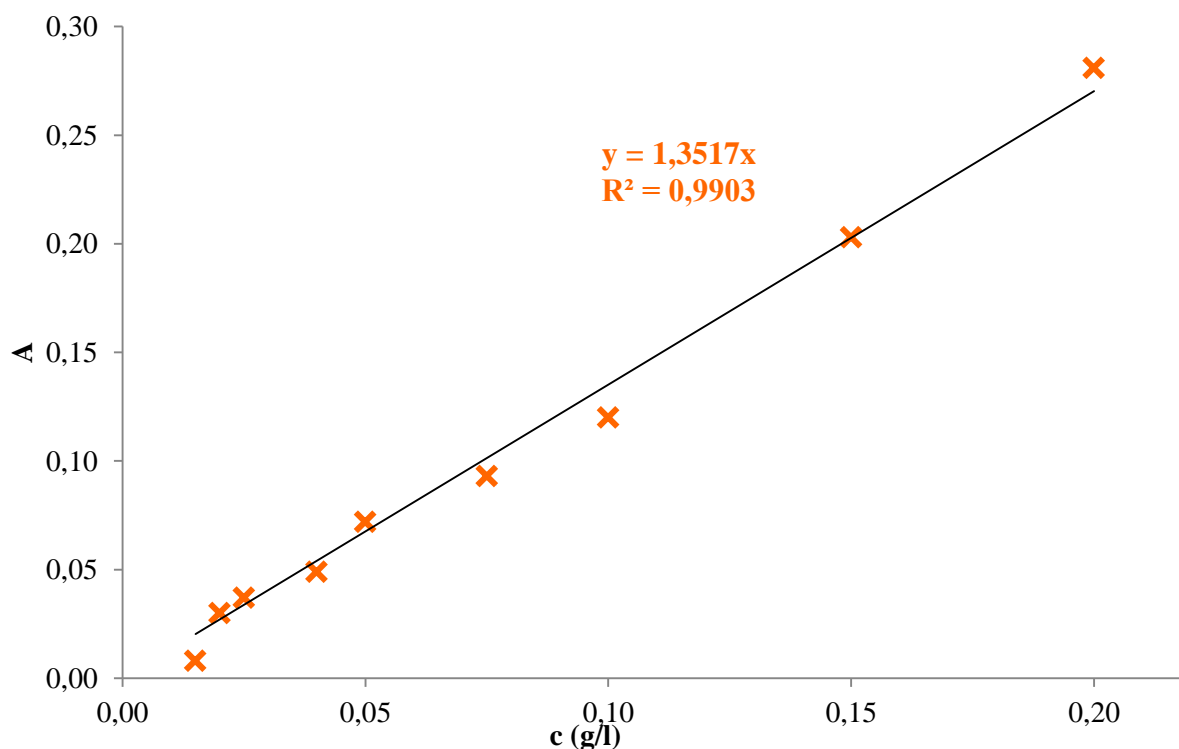


#### 4.1.2 Stanovení celkových polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteovým činidlem

Data pro stanovení kalibrační závislosti byla získána spektrofotometrickým měřením roztoků kyseliny gallové o různých koncentracích při vlnové délce 750 nm podle postupu v kapitole 3.5.1.

Tabulka 2: Závislost absorbance na koncentraci kyseliny gallové při vlnové délce 750 nm

Koncentrace kyseliny gallové $c$ (g/l)	Absorbance $A$ (750 nm)
0,015	0,008
0,020	0,030
0,025	0,037
0,040	0,049
0,050	0,072
0,075	0,093
0,100	0,120
0,150	0,203
0,200	0,281



Graf 2: Kalibrační závislost kyseliny gallové pro stanovení celkových polyfenolů při 750 nm

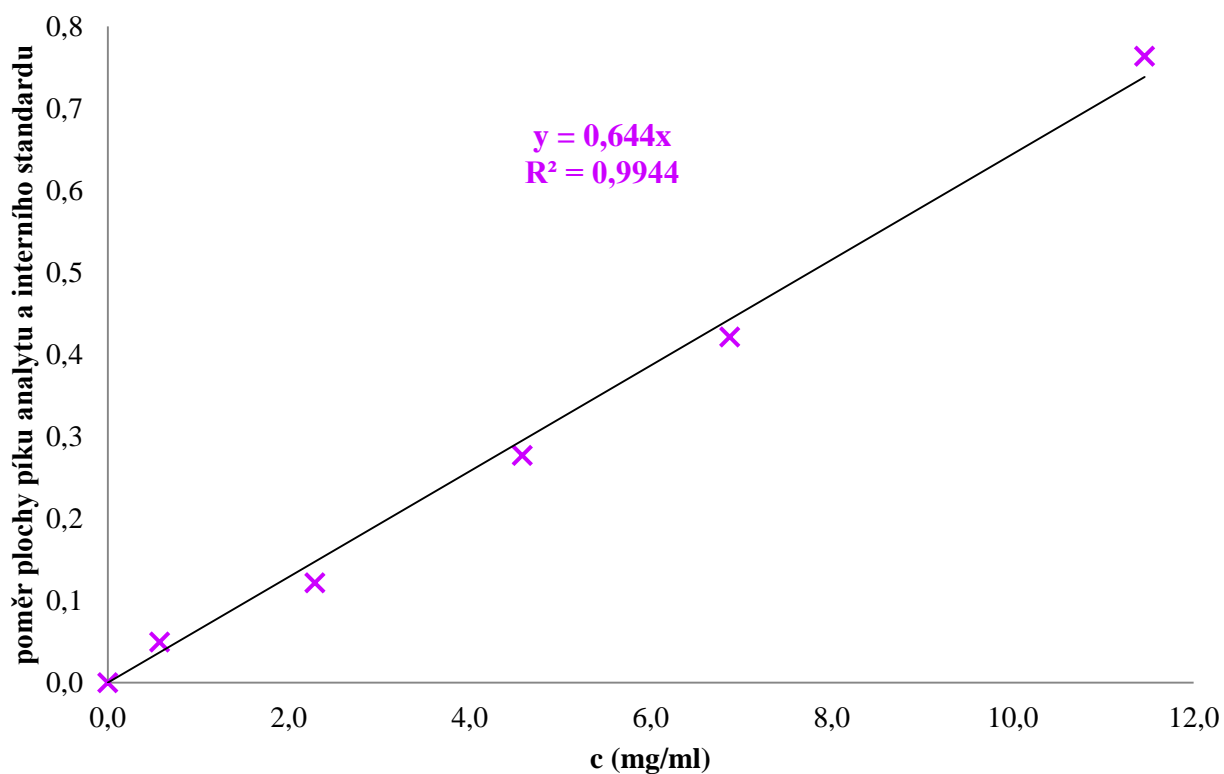
Ze závislosti absorbance na koncentraci byla stanovena kalibrační přímka  $y = 1,3517x$ , která byla použita pro stanovení koncentrace celkových polyfenolů. Regresní koeficient  $R^2 = 0,9903$ .

#### 4.1.3 Stanovení obsahu P(3HB) v biomase pomocí plynové chromatografie

Pro kvantitativní stanovení P(3HB) byla stanovena kalibrační přímka. Jedná se o závislost poměru plochy píku analytu a interního standardu na koncentraci P(3HB).

Tabulka 3: Závislost koncentrace 3HB na poměru plochy píku a interního standardu

Koncentrace 3HB c (mg/ml)	Poměr plochy píku analytu a interního standardu
0,000	0,0000
0,573	0,0493
2,292	0,1215
4,585	0,2770
6,877	0,4215
11,462	0,7636



Graf 3: Kalibrační závislost poměru plochy píku analytu a interního standardu na koncentraci 3HB

Ze závislosti poměru plochy píku analytu a interního standardu na koncentraci 3HB byla stanovena kalibrační závislost  $y = 0,644x$  s regresním koeficientem  $R^2 = 0,9944$ .

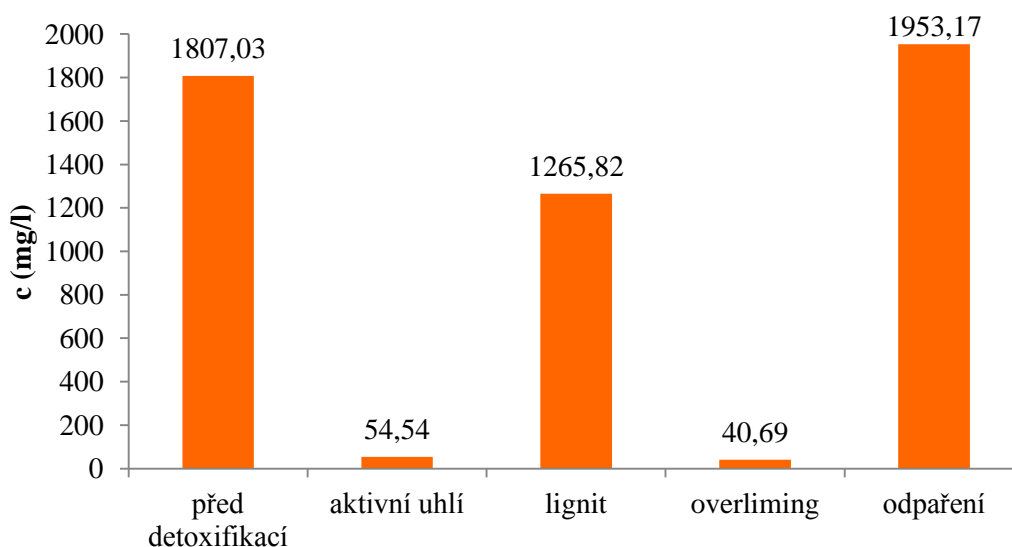
## 4.2 Detoxifikace hydrolyzátů

### 4.2.1 Vliv detoxifikace na koncentraci polyfenolů

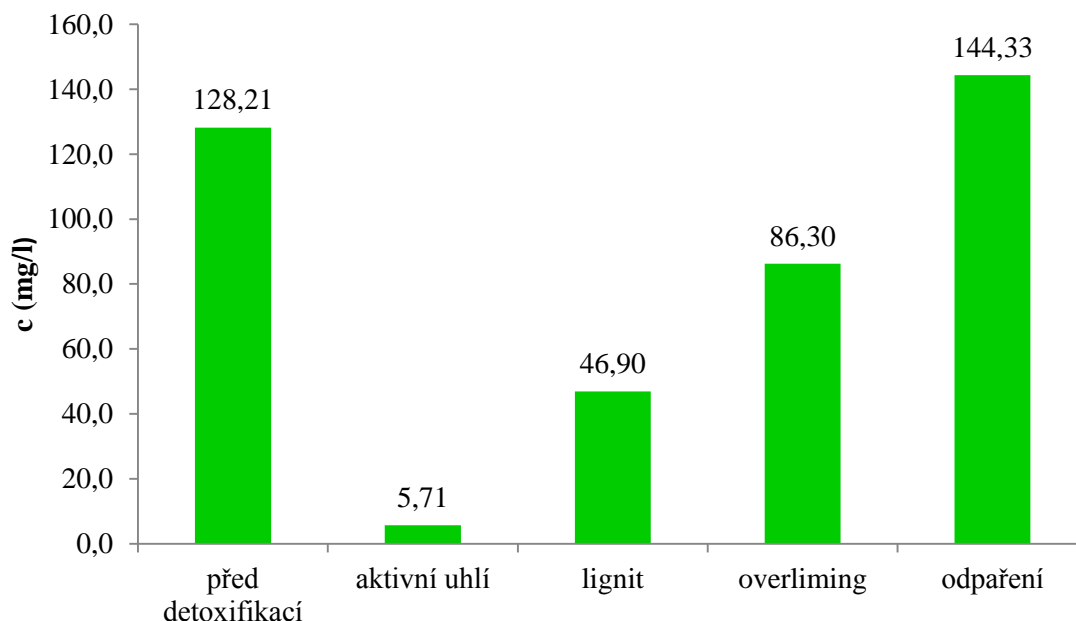
V rámci experimentální práce byly posouzeny různé detoxifikační metody k detoxifikaci dvou kultivačních médií – modelového hydrolyzátu, jehož složení bylo zvoleno s ohledem ke složení lignocelulózových hydrolyzátů připravovaných v rámci předchozích prací a je uvedeno v kapitole 3.3.1, druhým kultivačním médiem pak byl reálný hydrolyzát z pilin. Podrobný popis detoxifikačních postupů je uveden v kapitole 3.9. V rámci prvního experimentu byla posouzena efektivita detoxifikačních postupů vzhledem k polyfenolům, které často představují nejvýznamnější mikrobiální inhibitory přítomné v lignocelulózových hydrolyzátech.

Tabulka 4: Koncentrace celkových polyfenolů v modelovém hydrolyzátu a v hydrolyzátu z pilin před a po detoxifikaci

Modelový hydrolyzát	koncentrace celkových polyfenolů (mg/l)	efektivita detoxifikace (%)
před detoxifikací	1807,03 ± 16,31	
typ detoxifikace		
aktivní uhlí	54,54 ± 4,07	97,0
lignit	1265,82 ± 18,16	30,0
overliming	40,69 ± 2,71	97,8
odpaření	1953,17 ± 20,87	0,0
Hydrolyzát z pilin	koncentrace celkových polyfenolů (mg/l)	efektivita detoxifikace (%)
před detoxifikací	128,21 ± 5,99	
typ detoxifikace		
aktivní uhlí	5,71 ± 1,52	95,6
lignit	46,90 ± 1,01	63,4
overliming	86,30 ± 2,03	32,7
odpaření	144,33 ± 0,51	0,0



Graf 4: Koncentrace celkových polyfenolů v modelovém hydrolyzátu před a po detoxifikaci



Graf 5: Koncentrace celkových polyfenolů v hydrolyzátu z pilin před a po detoxifikaci

V modelovém hydrolyzátu a v hydrolyzátu z pilin byla stanovena koncentrace celkových polyfenolů, které působí inhibičně pro metabolismus mikroorganismů. V modelovém hydrolyzátu v tabulce 4 byla podle výsledku analýz koncentrace polyfenolů před detoxifikací 1807,03 mg/l a v hydrolyzátu z pilin 128,21 mg/l. Dále byl pak každý z hydrolyzátů detoxifikovaný čtyřmi různými metodami: aktivním uhlím, lignitem, overlimingem a odpařením.

Z tabulky 4 je vidět, že nejúčinnější detoxifikační metodou pro modelový hydrolyzát byla detoxifikace overlimingem, kdy koncentrace polyfenolů po detoxifikaci byla 40,69 mg/l, efektivita detoxifikace byla 97,8 %. Účinná byla také detoxifikace aktivním uhlím s residuální koncentrací polyfenolů 54,54 mg/l s efektivitou 97,0 %. Pro hydrolyzát z pilin to byla adsorpce na aktivní uhlí s residuální koncentrací polyfenolů 5,71 mg/l s efektivitou 95,6 % a detoxifikace pomocí lignitu (63,4 %) s koncentrací polyfenolů po této detoxifikaci 46,90 mg/l.

Rozdílná účinnost detoxifikačních metod vůči modelovému a reálnému hydrolyzátu bude pravděpodobně způsobena odlišným profilem polyfenolů. V modelovém hydrolyzátu byla jako polyfenol použita kyselina gallová, reálný hydrolyzát samozřejmě obsahoval směs různých fenolických látek, které pravděpodobně vykazovaly jiné sorpční vlastnosti. Obecně lze konstatovat, že detoxifikace odpařením neměla na koncentraci téměř žádný vliv, kdy u obou hydrolyzátů byla koncentrace polyfenolů téměř stejná jako v nedetoxifikovaných hydrolyzátech. Tento trend bylo možné předpokládat, protože odpaření se používá pro odstranění těkavých inhibitorů, mezi které polyfenoly nepatří.

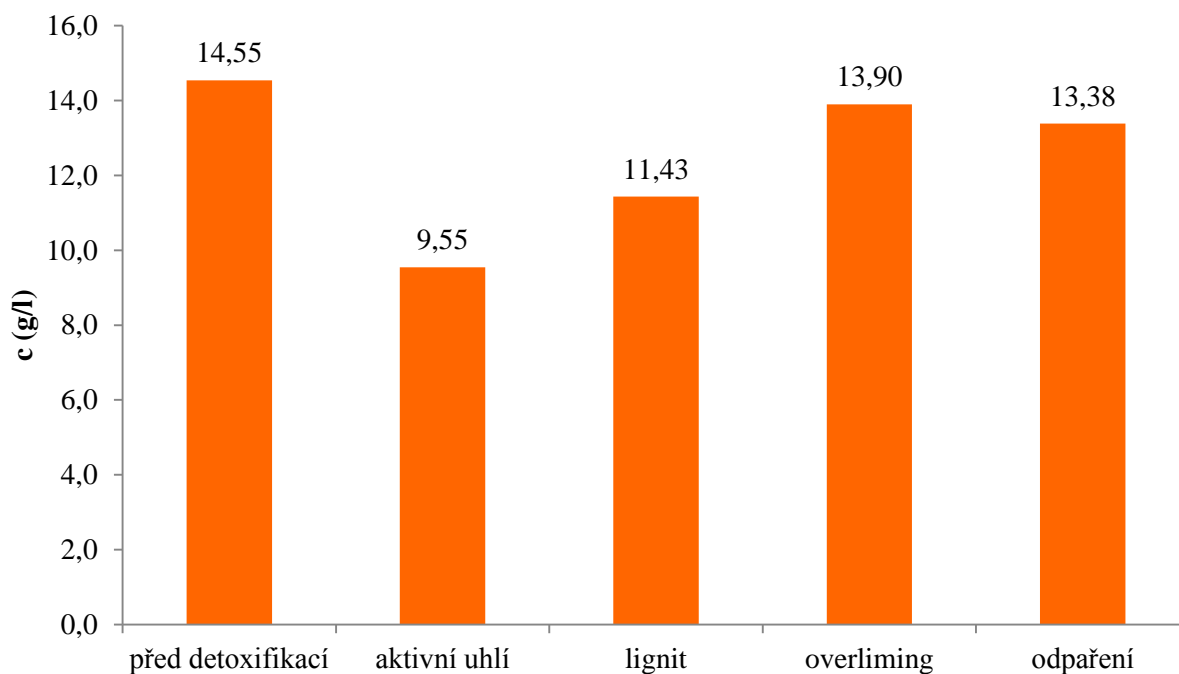
#### 4.3 Vliv detoxifikace na koncentraci redukujících sacharidů

Kromě žádoucí eliminace mikrobiálních inhibitorů může použití detoxifikačního kroku vést také k nežádoucímu snížení koncentrace fermentovatelných sacharidů. Proto dalším analyzovaným parametrem byla koncentrace redukujících sacharidů po detoxifikaci.

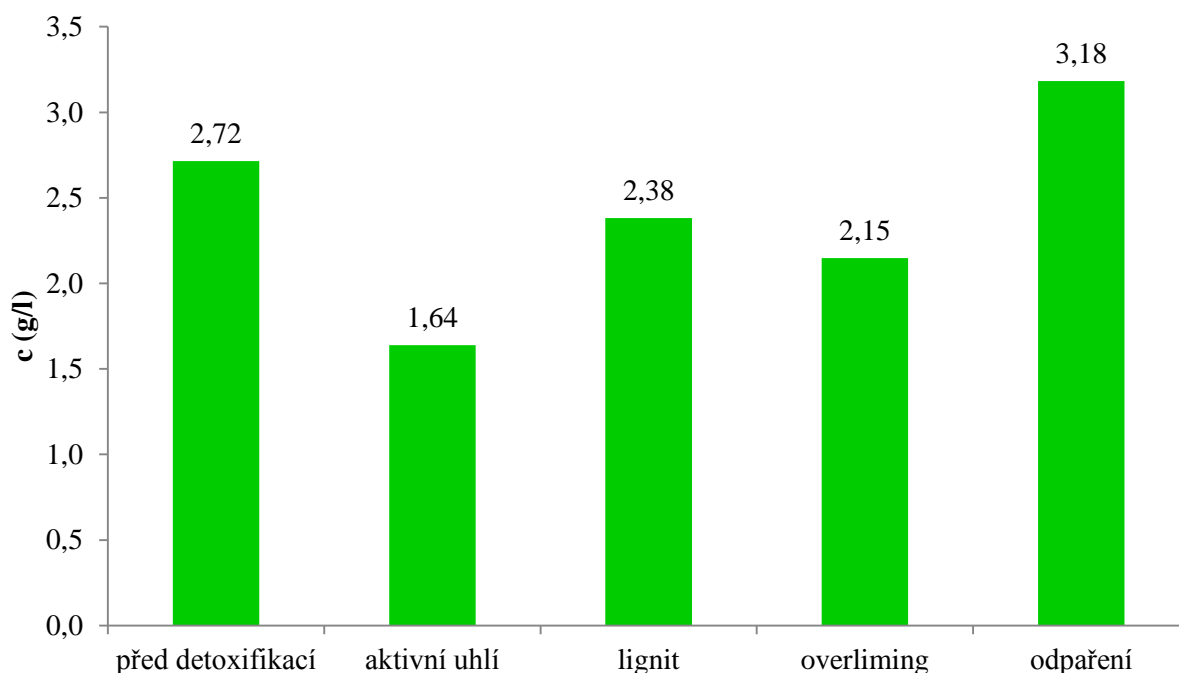
Tabulka 5: Výsledky koncentrace počátečních redukujících sacharidů v modelovém hydrolyzátu a v hydrolyzátu z pilin před a po detoxifikaci

<b>Modelový hydrolyzáat</b>	<b>koncentrace počátečních redukujících sacharidů (g/l)</b>	
před detoxifikací	14,55 ± 1,46	
<b>typ detoxifikace</b>		
aktivní uhlí	9,55 ± 0,25	
lignit	11,43 ± 0,70	
overliming	13,90 ± 1,84	
odpaření	13,38 ± 0,51	
<b>Hydrolyzáat z pilin</b>	<b>koncentrace počátečních redukujících sacharidů (g/l)</b>	<b>výtěžnost hydrolýzy (g/g)</b>
před detoxifikací	2,72 ± 0,00	0,05
<b>typ detoxifikace</b>		
aktivní uhlí	1,64 ± 0,01	0,03
lignit	2,38 ± 0,01	0,05
overliming	2,15 ± 0,00	0,04
odpaření	3,18 ± 0,31	0,06

Poznámka: Výtěžnost hydrolýzy je udávána v množství redukujících sacharidů (g) získaných z 1 g dřevěných pilin.



Graf 6: Koncentrace počátečních redukujících sacharidů v modelovém hydrolyzátu před a po detoxifikaci

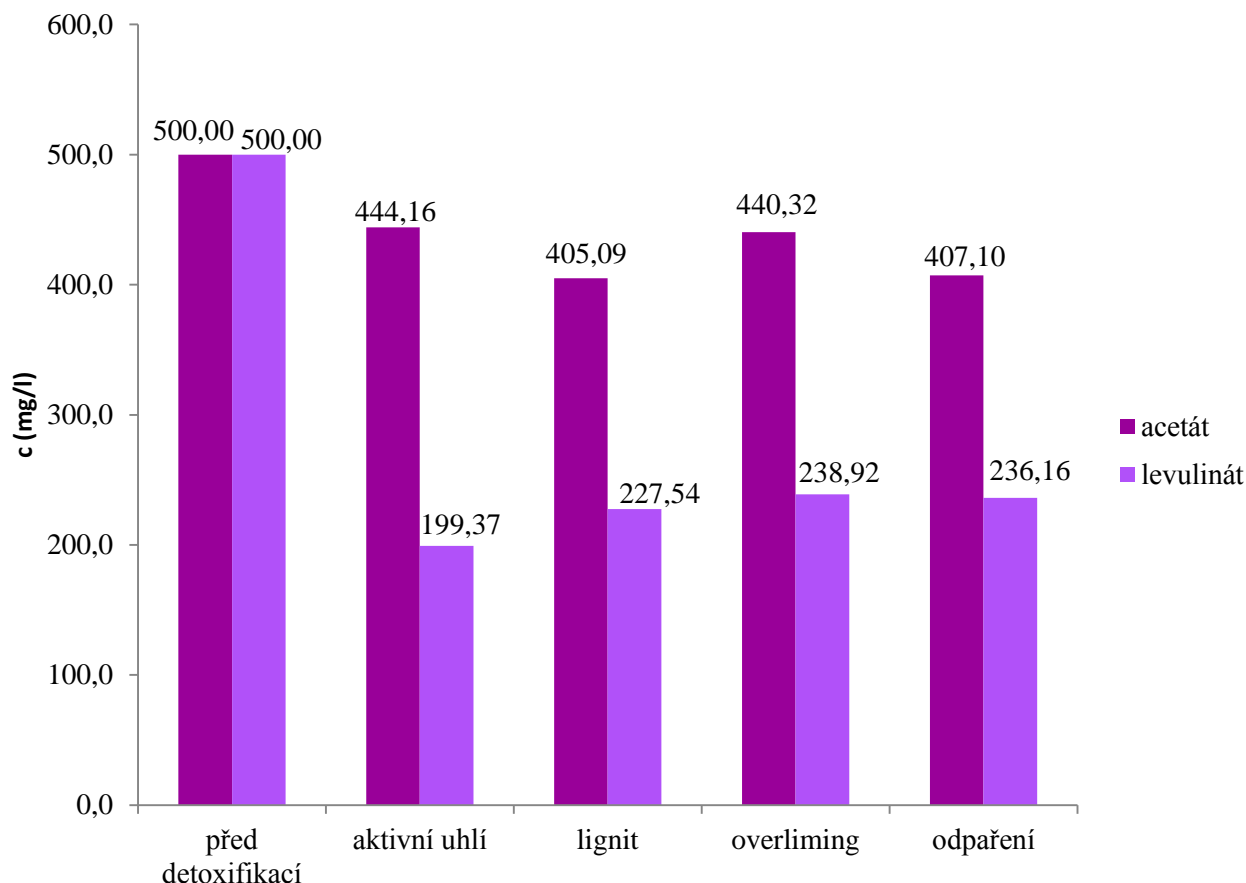


Graf 7: Koncentrace počátečních redukujících sacharidů v hydrolyzátu z pilin před a po detoxifikaci

Z tabulky 5 je zřejmé, že nejvyšší obsah počátečních redukujících sacharidů v modelovém hydrolyzátu po detoxifikaci zůstal v hydrolyzátu, který byl detoxifikovaný overlimingem s koncentrací 13,90 g/l z koncentrace před detoxifikací 14,55 g/l, jedná se tedy o 4,5 % úbytek sacharidů. Naopak nejnižší koncentrace počátečních redukujících sacharidů se nacházela v modelovém hydrolyzátu, který byl detoxifikovaný aktivním uhlím s koncentrací 9,55 g/l, což odpovídá 34,4 % úbytku sacharidů. Je tedy zřejmé, že aktivní uhlí je velice efektivní sorbent, který je možné využít k odstranění mikrobiálních inhibitorů, ale zároveň také dochází k významnému a nežádoucímu poklesu klíčového uhlíkatého zdroje – redukujících sacharidů. Stejný efekt je pak patrný i u hydrolyzátu z pilin, kdy použití aktivního uhlí snížilo obsah redukujících sacharidů o více než 30 %. V tomto kontextu se jako vhodnější detoxifikační postupy jeví použití lignitu jako sorbentu, který sice nedosahuje při eliminaci inhibitorů tak vysoké účinnosti jako aktivní uhlí, ale zároveň jeho aplikace nesnižuje koncentraci sacharidů.

#### 4.4 Stanovení koncentrace organických kyselin v modelovém hydrolyzátu pomocí iontové chromatografie

V modelovém hydrolyzátu byly iontovou chromatografií stanoveny koncentrace organických kyselin.



Graf 8: Zastoupení koncentrací kyseliny octové a kyseliny levulinové v modelovém hydrolyzátu před a po kultivaci, před a po detoxifikaci

Vliv detoxifikace na koncentraci organických kyselin byl studován pouze u modelového hydrolyzátu. Obecně lze říci, že žádná z použitých detoxifikačních technik nevykazovala vysokou účinnost eliminace sledovaných organických kyselin – octové a levulinové. Překvapivě byla nižší účinnost eliminace pozorována u kyseliny octové, kdy žádná z testovaných detoxifikačních technik (ani odpaření) nesnížila obsah kyseliny octové o více než 20 %. Větší eliminační účinnost byla pozorována u levulinátu, ale i v tomto případě zůstávalo v hydrolyzátech po detoxifikaci více než 40 % původní koncentrace této organické kyseliny. Zdá se tedy, že za podmínek použitých k detoxifikaci modelového hydrolyzátu nejsou použité detoxifikační postupy efektivními metodami pro odstranění organických kyselin.

#### 4.5 Biotechnologická produkce PHB na hydrolyzátech

Kultivace bakterií *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byla uskutečněna jak na hydrolyzátech, které byly podrobeny detoxifikaci, tak na hydrolyzátech, které detoxifikaci podrobeny nebyly. Následně byla spektrofotometricky stanovena koncentrace redukujících sacharidů, gravimetricky obsah biomasy, výtěžek hydrolyzy a také obsah PHB v biomase pomocí plynové chromatografie.

Tabulka 7: Koncentrace zbytkových redukcujících sacharidů po kultivaci v modelovém hydrolyzátu a v hydrolyzátu z pilin před a po detoxifikaci

<b><i>B. cepacia</i></b>	<b>koncentrace zbytkových redukcujících sacharidů (g/l)</b>	
	<b>modelový hydrolyzát</b>	<b>hydrolyzát z pilin</b>
před detoxifikací	0,18 ± 0,01	0,26 ± 0,02
<b>typ detoxifikace</b>		
aktivní uhlí	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,00
lignit	0,58 ± 0,00	0,19 ± 0,00
overliming	0,13 ± 0,00	0,20 ± 0,02
odpaření	0,30 ± 0,01	0,23 ± 0,03
<b><i>B. sacchari</i></b>	<b>koncentrace zbytkových redukcujících sacharidů (g/l)</b>	
	<b>modelový hydrolyzát</b>	<b>hydrolyzát z pilin</b>
před detoxifikací	0,12 ± 0,01	0,33 ± 0,00
<b>typ detoxifikace</b>		
aktivní uhlí	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,0
lignit	0,53 ± 0,10	0,25 ± 0,04
overliming	0,11 ± 0,01	0,23 ± 0,03
odpaření	0,12 ± 0,03	0,32 ± 0,00
<b><i>S. cerevisiae</i></b>	<b>koncentrace zbytkových redukcujících sacharidů (g/l)</b>	
	<b>modelový hydrolyzát</b>	<b>hydrolyzát z pilin</b>
před detoxifikací	2,32 ± 0,00	1,20 ± 0,01
<b>typ detoxifikace</b>		
aktivní uhlí	2,76 ± 0,06	0,97 ± 0,2
lignit	0,53 ± 0,10	1,02 ± 0,01
overliming	3,55 ± 0,31	1,03 ± 0,03
odpaření	1,77 ± 0,07	1,18 ± 0,01

V tabulce 7 lze vidět koncentrace redukcujících sacharidů v modelovém hydrolyzátu a hydrolyzátu z pilin po kultivaci dvou druhů bakterií: *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* a jedné kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Po zaočkování modelových a reálných hydrolyzátů těmito mikroorganismy se koncentrace redukcujících sacharidů snížila a to z toho důvodu, že jak bakterie, tak i kvasinka spotřebovala sacharidy k pokrytí svých energetických potřeb a syntézy jednotlivých komponent biomasy.

Při kultivacích bakterií byly obecně vyšší koncentrace residuálních sacharidů detekovány při kultivaci na hydrolyzátu pilin než u modelového hydrolyzátu, *Burkholderia cepacia* spotřebovala v modelovém hydrolyzátu, který byl detoxifikovaný overlimingem, největší množství redukcujících sacharidů a to s koncentrací 0,13 g/l z celkové hodnoty koncentrace 13,90 g/l, jedná se tedy o 99,0 % úbytek sacharidů. Naopak nejhorší spotřebu měla v modelovém hydrolyzátu, který byl detoxifikovaný lignitem a to s koncentrací redukcujících sacharidů 0,53 g/l z celkové koncentrace redukcujících sacharidů 11,43 g/l s 95,0 % úbytkem. *Burkholderia sacchari* zužitkovala největší množství redukcujících sacharidů v modelovém hydrolyzátu také detoxifikovaném overlimingem a to s 99,2 % úbytkem redukcujících sacharidů. Počáteční koncentrace redukcujících sacharidů při této detoxifikaci byla 13,90 g/l



a klesla na 0,11 g/l. S nejnižším úbytkem redukujících sacharidů, který byl 95,4 %, zužitkovala bakterie *B. sacchari* v modelovém hydrolyzátu, který byl detoxifikován lignitem. Koncentrace zbytkových redukujících sacharidů v tomto detoxifikovaném hydrolyzátu byla 0,11 g/l z koncentrace počátečních redukujících sacharidů 13,90 g/l. Při pohledu na *tabulku 7*, kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* spotřebovala mnohem menší množství redukujících sacharidů, než bakterie *B. cepacia* a *B. sacchari*. Při detoxifikaci modelového hydrolyzátu odpařením, zužitkovala největší množství redukujících sacharidů s 86,6 % úbytkem, kdy koncentrace počátečních redukujících sacharidů byla 13,38 g/l a koncentrace zbytkových redukujících sacharidů byla 1,77 g/l.

*Burkholderia cepacia* v hydrolyzátu z pilin, který byl detoxifikovaný aktivním uhlím, zužitkovala největší množství redukujících sacharidů a to s 93,7 % úbytkem, kdy na počátku byla koncentrace redukujících sacharidů 1,64 g/l a klesla na koncentraci 0,103 g/l. Naopak v hydrolyzátu z pilin, který byl detoxifikovaný overlímingem, spotřebovala nejnižší množství redukujících sacharidů a to s koncentrací počátečních redukujících sacharidů 2,15 g/l na koncentraci zbytkových redukujících sacharidů 0,20 g/l s úbytkem sacharidů 90,6 %. *Burkholderia sacchari* zužitkovala největší množství redukujících sacharidů v reálném hydrolyzátu, který byl detoxifikován aktivním uhlím, stejně tak jako bakterie *Burkholderia cepacia*. Zpočátku koncentrace redukujících sacharidů byla 1,64 g/l a klesla na hodnotu koncentrace 0,06 g/l. Úbytek sacharidů tak byl 96,0 %. Naopak nejnižší spotřeba sacharidů u této bakterie byla zaznamenána v hydrolyzátu z pilin, který detoxifikovaný vůbec nebyl. Počáteční koncentrace redukujících sacharidů byla 2,72 g/l, kde klesla na hodnotu 0,33 g/l s 87,9 % úbytkem redukujících sacharidů. Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* zužitkovala největší množství redukujících sacharidů v hydrolyzátu z pilin, který byl upraven odpařením a to s počáteční koncentrací redukujících sacharidů 3,18 g/l a s koncentrací zbytkových redukujících sacharidů 1,18 g/l. Úbytek sacharidů byl tedy 62,9 %. Hydrolyzát z pilin adsorbovaný na aktivní uhlí obsahoval u této kvasinky naopak nejnižší úbytek redukujících sacharidů a to s hodnotou 40,7 %, s koncentrací počátečních redukujících sacharidů 1,64 g/l a zbytkových redukujících sacharidů 0,97 g/l. Dalším parametrem, který byl analyzován po kultivaci, byla koncentrace polyfenolů. Výsledky jsou presentovány v tabulce 8,

Tabulka 8: Koncentrace polyfenolů na modelovém hydrolyzátu a na hydrolyzátu z pilin po kultivaci před a po detoxifikaci

<b><i>B. cepacia</i></b>	<b>koncentrace polyfenolů po kultivaci (mg/l)</b>	
	<b>modelový hydrolyzát</b>	<b>hydrolyzát z pilin</b>
před detoxifikací	204,03 ± 0,01	94,54 ± 1,52
<b>typ detoxifikace</b>		
aktivní uhlí	69,59 ± 2,52	23,62 ± 0,51
lignit	278,30 ± 40,63	45,82 ± 3,55
overliming	76,99 ± 0,00	61,23 ± 4,05
odpaření	141,70 ± 0,01	79,50 ± 0,51
<b><i>B. sacchari</i></b>	<b>koncentrace polyfenolů po kultivaci (mg/l)</b>	
	<b>modelový hydrolyzát</b>	<b>hydrolyzát z pilin</b>
před detoxifikací	109,47 ± 10,94	33,65 ± 0,51
<b>typ detoxifikace</b>		
aktivní uhlí	71,50 ± 0,01	4,99 ± 0,51

lignit	261,82 ± 0,10	54,07 ± 1,01
overliming	76,51 ± 2,87	72,69 ± 1,01
odpaření	102,06 ± 14,86	20,04 ± 0,51
<b><i>S. cerevisiae</i></b>	<b>koncentrace polyfenolů po kultivaci (mg/l)</b>	
	<b>modelový hydrolyzát</b>	<b>hydrolyzát z pilin</b>
před detoxifikací	686,50 ± 6,96	60,155 ± 7,598
<b>typ detoxifikace</b>		
aktivní uhlí	35,25 ± 0,25	33,29 ± 6,08
lignit	564,69 ± 20,53	37,59 ± 1,01
overliming	35,31 ± 0,68	21,83 ± 1,01
odpaření	960,66 ± 0,97	77,35 ± 0,51

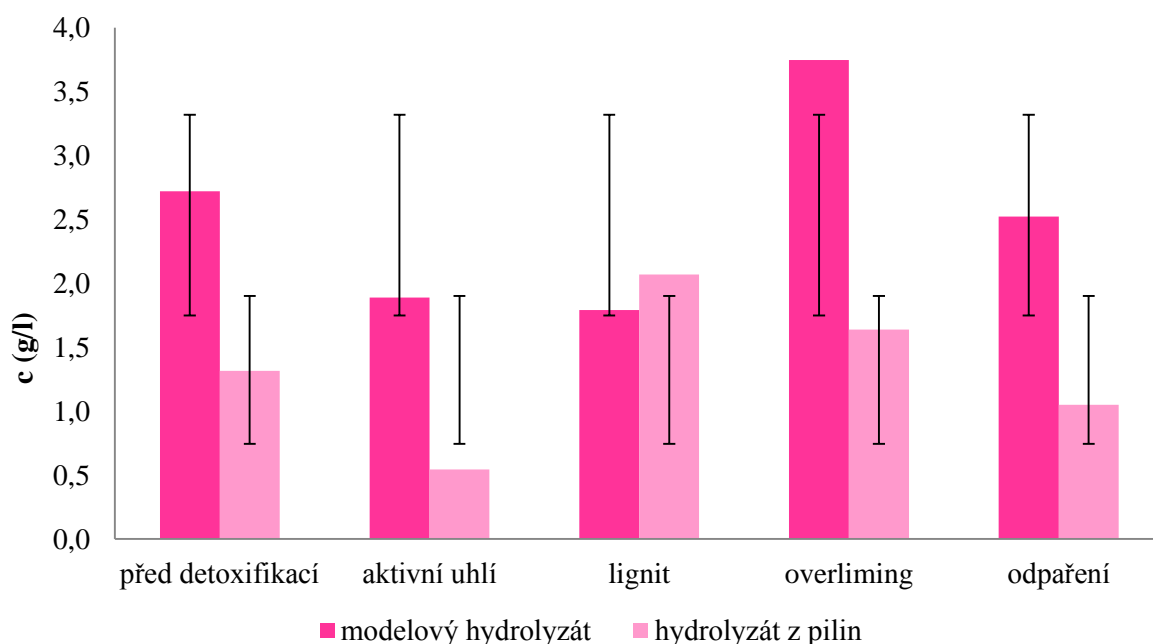
Je zajímavé, že ve většině případů došlo během kultivace mikroorganismů v hydrolyzátech k navýšení koncentrace polyfenolů. Je nepravděpodobné, že by bakterie anebo kvasinky produkovaly takto významné množství fenolických látek. Spíše je možné, že během kultivace došlo k transformaci fenolických látek na produkty, které dávají ji při spektrofotometrickém stanovení vyšší signál a tedy i zdánlivě vyšší koncentraci případně je možné, že mikroorganismy do jisté míry produkovaly látky, které při spektrofotometrickém stanovení polyfenolů interferují.

*Tabulka 8* ukazuje, že po kultivaci bakterií *B. cepacia* v modelovém hydrolyzátu, který byl detoxifikovaný overlimingem a aktivním uhlím, došlo ke zdánlivému navýšení koncentrace polyfenolů a to u detoxifikace aktivním uhlím o 27,6 % a u detoxifikace overlimingem dokonce až o 89,2 %. Koncentrace celkových polyfenolů v modelovém hydrolyzátu adsorbovaném na aktivní uhlí byla 54,54 mg/l a zdánlivě se zvýšila na koncentraci 69,59 mg/l, v modelovém hydrolyzátu upraveném overlimingem byla koncentrace celkových polyfenolů 40,69 mg/l a koncentrace polyfenolů po kultivaci byla stanovena jako 76,990 mg/l. Naopak u hydrolyzátu s vysokým počátečním obsahem polyfenolů tedy toho, který byl detoxifikován odpařením, byl úbytek polyfenolů až o 92,7 % s koncentrací celkových polyfenolů 1953,17 mg/l a s koncentrací polyfenolů po kultivaci 141,70 mg/l. *Burkholderia sacchari* stejně tak jako *B. cepacia* zvýšila množství polyfenolů v modelovém hydrolyzátu detoxifikovaném také overlimingem a aktivním uhlím. Navýšení polyfenolů u takto detoxifikovaných hydrolyzátů bylo u adsorpce na aktivní uhlí o 31,1 % a u metody overlimingem až o 88 %. Koncentrace celkových polyfenolů v hydrolyzátu detoxifikovaný overlimingem byla 40,69 mg/l a zvýšila se na stanovenou koncentraci polyfenolů po kultivaci 76,51 mg/l, u hydrolyzátu adsorbovaném na aktivní uhlí byla koncentrace celkových polyfenolů 54,54 mg/l se také zvýšila na koncentraci polyfenolů po kultivaci 71,50 mg/l. Naopak nejvyšší úbytek polyfenolů byl až o 94,77 % a to u modelového hydrolyzátu, který byl detoxifikovaný odpařením a to s koncentrací celkových polyfenolů 1953,17 mg/l a s koncentrací polyfenolů po kultivaci 102,06 mg/l. Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* snížila největší množství v modelovém hydrolyzátu, který detoxifikovaný vůbec nebyl a to s koncentrací celkových polyfenolů 1807,03 mg/l na koncentraci polyfenolů po kultivaci 686,50 mg/l. Množství polyfenolů v tomto hydrolyzátu kleslo o 62,0 %. V modelovém hydrolyzátu detoxifikovaném pomocí metody overliming, byl pokles nejnižší a to o 13,2 %. Koncentrace celkových polyfenolů v tomto hydrolyzátu byla 40,69 mg/l a klesla pouze na koncentraci polyfenolů po kultivaci 35,31 mg/l.

V *tabulce 8* lze vidět, že po zaočkování reálného hydrolyzátu z pilin *B. cepacia*, se mnohonásobně navýšila koncentrace z celkových polyfenolů 23,62 mg/l na koncentraci

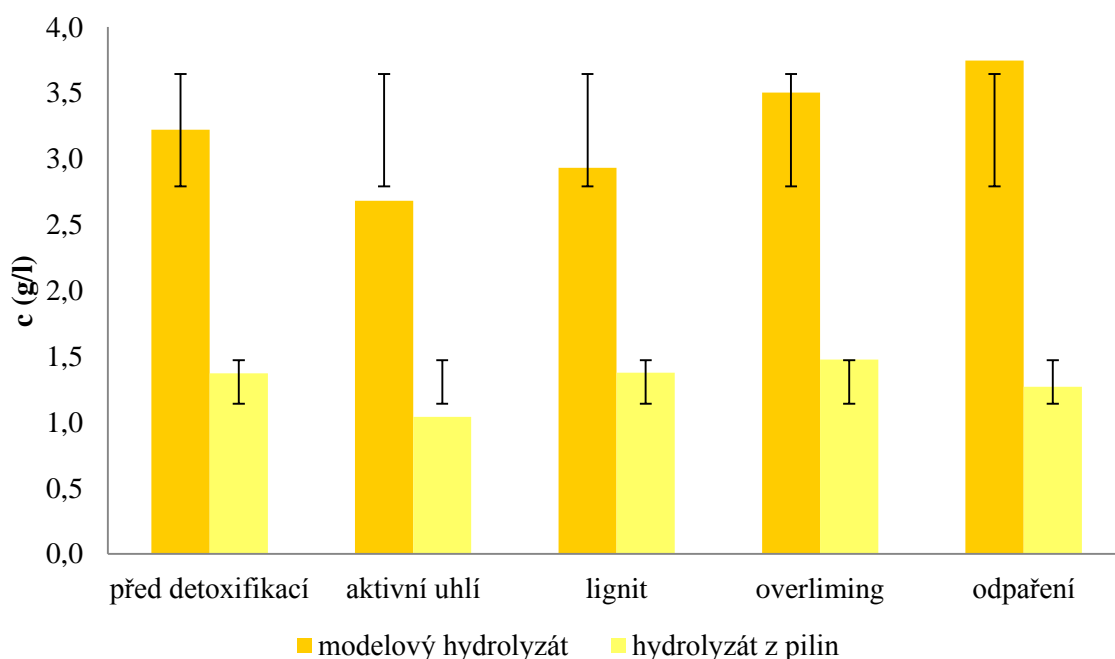
polyfenolů po kultivaci 5,71 mg/l a to u detoxifikaci aktivním uhlím. Nejnižší pokles polyfenolů během kultivace touto bakterií došlo u hydrolyzátu z pilin, který byl detoxifikovaný lignitem a to o pouhých o 2,3 %. Koncentrace celkových polyfenolů, tedy polyfenolů před kultivací byla 46,90 mg/l a koncentrace polyfenolů po kultivaci 45,83 mg/l. Naopak nejvyšší úbytek polyfenolů (44,9 %) se nacházel v hydrolyzátu z pilin detoxifikovaném odpařením. Koncentrace celkových polyfenolů u téhle detoxifikační metody byla 144,33 mg/l a klesla na koncentraci polyfenolů po kultivaci 79,50 mg/l. *Burkholderia sacchari* také navýšila množství polyfenolů po její kultivaci jako *B. cepacia* v hydrolyzátu z pilin, který byl detoxifikovaný lignitem. Jednalo se o navýšení polyfenolů o 15,3 %, kdy koncentrace celkových polyfenolů byla 46,90 mg/l a koncentrace polyfenolů po kultivaci touto bakterií 54,07 mg/l. U hydrolyzátu z pilin, který byl detoxifikovaný odpařením, byl zaznamenán nejvyšší úbytek polyfenolů po kultivaci touto bakterií a to o 86,1 %. Koncentrace celkových polyfenolů byla 144,33 mg/l a koncentrace polyfenolů po kultivaci 20,04 mg/l. Téměř žádný úbytek po kultivaci byl v hydrolyzátu z pilin detoxifikovaný adsorpcí na aktivní uhlí a to s procentuálním úbytkem polyfenolů 12,5 %. Koncentrace celkových polyfenolů byla 5,71 mg/l a koncentrace polyfenolů po kultivaci 4,99 mg/l. *Saccharomyces cerevisiae* navýšila také množství polyfenolů v jednom z hydrolyzátů z pilin a to v hydrolyzátu, který byl detoxifikovaný aktivním uhlím, stejně tak jako bakterie *B. cepacia*. Jednalo se o navýšení z koncentrace celkových polyfenolů 5,71 mg/l na koncentraci polyfenolů po kultivaci 33,29 mg/l. Po kultivaci touto kvasinkou se nejvíce snížilo množství polyfenolů v hydrolyzátu z pilin, který byl detoxifikovaný overlimingem a to o 74,7 %. Koncentrace polyfenolů před kultivací byla 86,30 mg/l a koncentrace polyfenolů po kultivaci 21,83 mg/l. Nejnižší úbytek polyfenolů (19,9 %) po kultivaci kvasinky se nacházelo v hydrolyzátu z pilin detoxifikovaného lignitem a to s koncentrací celkových polyfenolů 46,90 mg/l na koncentraci polyfenolů po kultivaci 37,59 mg/l.

#### 4.6 Výtěžky biomasy a PHB



Graf 9: Koncentrace biomasy u bakterie *Burkholderia cepacia* na modelovém hydrolyzátu a hydrolyzátu z pilin před a po detoxifikaci

V grafu 9 jsou znázorněny výtěžky biomasy získané kultivací bakterie *B. cepacia* na detoxifikovaných i nedetoxifikovaných hydrolyzátech. Je zajímavé, že u modelového hydrolyzátu bylo využití klasických sorpčních detoxifikačních technik (aktivní uhlí, lignit) z pohledu růstu biomasy v podstatě negativní. To demonstruje fakt, že detoxifikace hydrolyzátu je komplexní proces a pro ověření detoxifikačního postupu nestačí analytické výstupy jednoduše popisující koncentraci inhibitorů po detoxifikaci, ale je zároveň nezbytné ověřit fermentovatelnost hydrolyzátu pomocí konkrétního produkčního systému. Například přesto, že aktivní uhlí velice efektivně eliminovalo polyfenoly, měla detoxifikační metoda s využitím aktivního uhlí na růst biomasy negativní efekt. Je možné, že částečně může být tento efekt připsán snížení koncentrace sacharidů, které aktivní uhlí způsobilo. Naopak, pozitivní efekt na růst biomasy měla u obou hydrolyzátů detoxifikace pomocí overlimingu, která vykazuje vysokou schopnost eliminace fenolických látek, nicméně neodstraňuje fermentovatelné sacharidy.

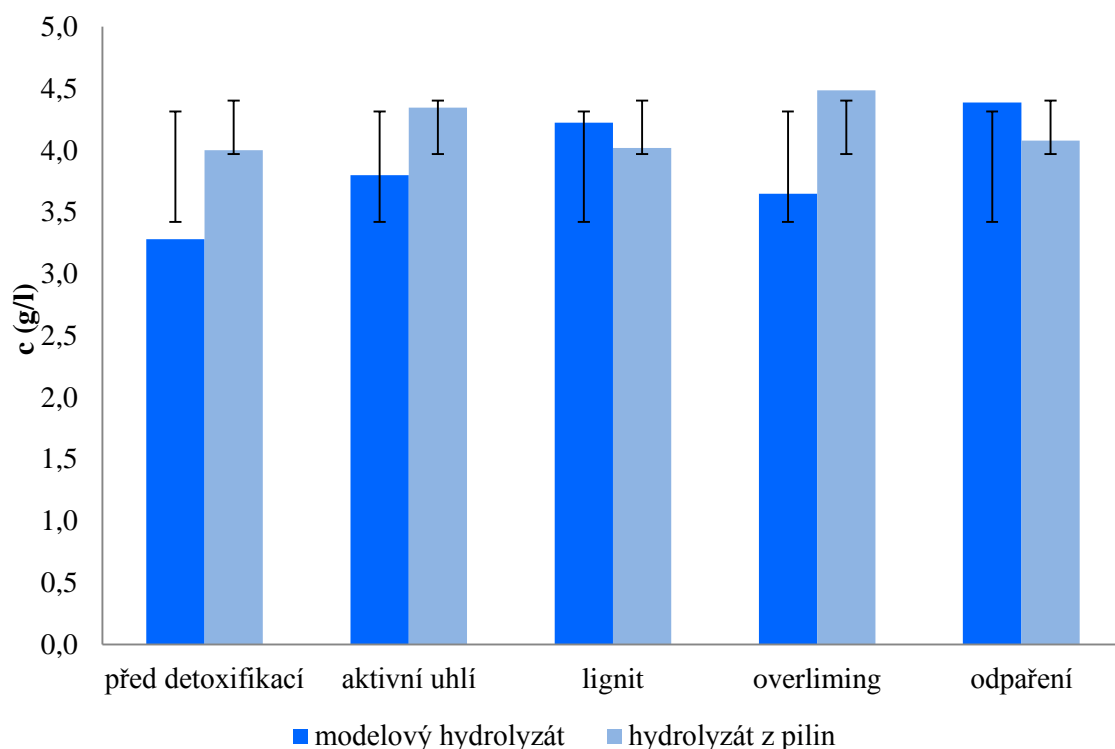


Graf 10: Koncentrace biomasy u bakterie *Burkholderia sacchari* na modelovém hydrolyzátu a hydrolyzátu z pilin před a po detoxifikaci

Jiným způsobem reagovala bakterie *B. sacchari* což jen dokládá fakt, že detoxifikační proces je vždy třeba testovat s konkrétním mikroorganismem. Rozdíly mezi detoxifikovaným a nedetoxifikovaným hydrolyzátem byly v tomto případě výrazně menší, než tomu bylo u *B. cepacia*, nicméně lepších výtěžků bylo opět dosaženo při využití overlimingu

V grafu 10 lze vidět nejvyšší zastoupení biomasy 3,75 g/l a to v modelovém hydrolyzátu, který byl detoxifikovaný odpařením a také nejnižší zastoupení biomasy 2,68 g/l v modelovém hydrolyzátu detoxifikovaného aktivním uhlím po kultivaci *Burkholderii sacchari*.

V reálném hydrolyzátu, který byl detoxifikovaný overlimingem se nacházela nejvyšší koncentrace biomasy 1,48 g/l a při detoxifikaci hydrolyzátu aktivním uhlím, byla koncentrace biomasy 1,04 g/l naopak nejnižší.



Graf 11: Koncentrace biomasy u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* na modelovém hydrolyzátu a hydrolyzátu z pilin před a po detoxifikaci

Obdobný efekt jako *B. sacchari* můžeme pozorovat také kvasinky *S. cerevisiae* – ani v tomto případě nemělo použití detoxifikačních metod na růst mikroorganismu výrazný vliv. Graf 11 srovnává detoxifikované hydrolyzáty jak modelové, tak i reálné a to po kultivaci kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Nejvyšší zastoupení biomasy s koncentrací 4,39 g/l se nacházelo v modelovém hydrolyzátu, který byl detoxifikovaný odpařením. S koncentrací biomasy 3,28 g/l v nedetoxifikovaném modelovém hydrolyzátu bylo nejnižší.

Reálný hydrolyzát kultivovaný touto kvasinkou, který byl detoxifikovaný overlimingem, měl nejvyšší koncentraci biomasy 4,49 g/l. Nejnižší koncentrace biomasy 4,02 g/l se nacházela v hydrolyzátu z pilin, který detoxifikovaný nebyl. V následujících tabulkách jsou shrnuty biotechnologické produkce PHB dosažené na detoxifikovaných i nedetoxifikovaných hydrolyzátech pomocí bakterií *B. cepacia* a *B. sacchari*.

Tabulka 9: Koncentrace biomasy a PHB a procentuální zastoupení PHB v biomase u bakterie *Burkholderia cepacia* před a po detoxifikaci modelového hydrolyzátu a hydrolyzátu z pilin

<i>B. cepacia</i>	Modelový hydrolyzát		
	koncentrace biomasy (g/l)	koncentrace PHB (g/l)	PHB (%)
před detoxifikací	2,72 ± 0,13	0,34 ± 0,03	34,3 ± 2,4
<b>typ detoxifikace</b>			
aktivní uhlí	1,89 ± 0,30	0,20 ± 0,01	19,7 ± 0,9
lignit	1,79 ± 0,64	0,09 ± 0,00	9,3 ± 0,3
overliming	3,75 ± 1,91	0,24 ± 0,05	23,7 ± 4,8
odpaření	2,52 ± 0,27	0,31 ± 0,01	30,8 ± 0,7

<b><i>B. cepacia</i></b>	<b>Hydrolyzát z pilin</b>		
	<b>koncentrace biomasy (g/l)</b>	<b>koncentrace PHB (g/l)</b>	<b>PHB (%)</b>
před detoxifikací	1,32 ± 0,13	0,05 ± 0,01	4,7 ± 0,0
<b>typ detoxifikace</b>			
aktivní uhlí	0,55 ± 0,30	0,12 ± 0,02	11,8 ± 0,8
lignit	2,07 ± 0,64	0,17 ± 0,02	16,1 ± 0,9
overliming	1,64 ± 1,91	0,15 ± 0,00	13,7 ± 0,3
odpaření	1,05 ± 0,27	0,08 ± 0,04	8,3 ± 1,2

*Tabulka 9* srovnává koncentraci PHB ke koncentraci k biomase po zaočkování bakterií *Burkholderii cepacia*.

Nejvyšší poměr koncentrace PHB ku koncentraci biomasy se nacházel v modelovém hydrolyzátu detoxifikovaném odpařením (0,31 g/l ku 2,52 g/l) s procentuálním výtěžkem PHB 30,8 %, ale také v modelovém hydrolyzátu, který detoxifikovaný nebyl (0,34 g/l ku 2,72 g/l) s procentuálním výtěžkem PHB 34,3 %. Nejnižší poměr koncentrace PHB ku koncentraci biomasy byl v modelovém hydrolyzátu, který byl detoxifikovaný lignitem (0,09 g/l ku 1,79 g/l) s procentuálním výtěžkem PHB 9,3 %. V tomto kontextu je u modelového hydrolyzátu možné vyhodnotit všechny použité detoxifikační metody jako neúspěšné, protože nejvyšších výtěžků PHB bylo dosaženo u modelového roztoku, který nebyl nijak detoxifikován.

Jinou situaci však můžeme pozorovat u reálného hydrolyzátu pilin. V tomto případě mají prakticky všechny využitě detoxifikační postupy pozitivní dopad na produkci PHB oproti hydrolyzátu, který nebyl nijak detoxifikován. Je možné, že tyto rozdíly jsou způsobeny vyšší koncentrací fermentovatelných sacharidů v modelovém roztoku. Zatímco v modelovém roztoku byla koncentrace sacharidů cca 7x vyšší a je možné, že vyšší koncentrace sacharidů mohli pomoci bakteriální kultuře adaptovat se na vyšší koncentrace inhibitorů. Naopak u reálného hydrolyzátu pilin byla koncentrace sacharidů nízká, a proto byl pozitivní efekt detoxifikace výraznější a pozitivní.

Co se týče hydrolyzátu z pilin, nejvyšší poměr koncentrace PHB ku koncentraci biomasy se nacházel v hydrolyzátu detoxifikovaném lignitem (0,17 g/l ku 0,64 g/l) s procentuálním výtěžkem PHB 16,1 %. Naopak nejnižší poměr koncentrace PHB ku koncentraci biomasy se nacházel v hydrolyzátu, který detoxifikovaný nebyl (0,05 g/l ku 1,32 g/l) s procentuálním výtěžkem PHB 4,7 %. Nicméně celkově je nutné konstatovat, že výtěžky PHB na reálném hydrolyzátu jsou nízké a za daných podmínek pravděpodobně nedávají šanci na ekonomicky rentabilní proces produkce PHB z dřevní biomasy.

*Tabulka 10: Koncentrace biomasy, PHB a procentuální zastoupení PHB v biomase u bakterie Burkholderia sacchari před a po detoxifikaci modelového hydrolyzátu a hydrolyzátu z pilin*

<b><i>B. sacchari</i></b>	<b>Modelový hydrolyzát</b>		
	<b>koncentrace biomasy (g/l)</b>	<b>koncentrace PHB (g/l)</b>	<b>PHB (%)</b>
před detoxifikací	3,22 ± 0,15	0,48 ± 0,07	48,7 ± 7,6
<b>typ detoxifikace</b>			
aktivní uhlí	2,68 ± 0,10	0,29 ± 0,01	29,0 ± 0,3
lignit	2,93 ± 0,31	0,20 ± 0,00	20,0 ± 0,0
overliming	3,50 ± 0,80	0,36 ± 0,13	35,8 ± 13,2
odpaření	3,75 ± 0,56	0,46 ± 0,00	45,8 ± 0,6



<i>B. sacchari</i>	Hydrolyzát z pilin		
	koncentrace biomasy (g/l)	koncentrace PHB (g/l)	PHB (%)
před detoxifikací	1,37 ± 0,04	0,06 ± 0,00	6,2 ± 0,3
<b>typ detoxifikace</b>			
aktivní uhlí	1,04 ± 0,39	0,16 ± 0,01	14,3 ± 0,9
lignit	1,38 ± 0,12	0,15 ± 0,01	18,3 ± 1,7
overliming	1,48 ± 0,13	0,06 ± 0,01	9,7 ± 1,9
odpaření	1,27 ± 0,06	0,07 ± 0,00	7,3 ± 0,6

Prakticky stejný trend jako u *B. cepacia* můžeme pozorovat také u *B. sacchari* – i v tomto případě nebyl u modelového hydrolyzátu pozorován pozitivní efekt detoxifikace – naopak vložení detoxifikačního kroku mělo negativní dopad na výtěžky PHB. Naopak u reálného hydrolyzátu došlo ve všech případech při vřazení detoxifikace k podpoření produkce PHB.

V *tabulce 10* lze vidět, jak detoxifikované modelové tak i detoxifikované reálné hydrolyzáty, které byly zaočkovány bakterií *Burkholderii sacchari*. Při srovnání koncentrace PHB ku koncentraci biomasy v modelovém hydrolyzátu, byl nejvyšší poměr v hydrolyzátu, který byl detoxifikovaný odpařením (0,46 g/l ku 3,75 g/l) s procentuálním výtěžkem PHB 45,8 %, ale také v hydrolyzátu, který detoxifikovaný nebyl (0,48 g/l ku 3,22 g/l) s procentuálním výtěžkem PHB 48,7 %. Úplně nejnižší zastoupení těchto poměrů koncentrací se nacházel v modelovém hydrolyzátu detoxifikovaném lignitem (0,199 g/l ku 2,933 g/l) s procentuálním výtěžkem PHB 20,0 %. Nejnižší poměr koncentrace PHB ku koncentraci biomasy bylo v reálném hydrolyzátu detoxifikovaného lignitem (0,15 g/l ku 1,38 g/l) s procentuálním výtěžkem PHB 18,3 %. V hydrolyzátu z pilin, který detoxifikovaný nebyl, bylo nejnižší poměrové zastoupení těchto koncentrací (0,06 g/l ku 1,37 g/l) s procentuálním výtěžkem PHB 6,2 %.

Při srovnání obou tabulek (*tabulka 9 a 10*) bylo poměrové zastoupení koncentrací u obou bakterií *B. cepacia* a *B. sacchari* stejné, co se týče metod detoxifikace. V *tabulkách 9 a 10* lze také vidět a také říct, že nejvyšší poměrové zastoupení koncentrace PHB a koncentrace biomasy se nacházelo v hydrolyzátu z pilin, který byl detoxifikovaný aktivním uhlím a to jak u bakterie *Burkholderia cepacia* (0,12 g/l ku 0,55 g/l), tak i u bakterie *Burkholderia sacchari* (0,16 g/l ku 1,04 g/l). V hydrolyzátu z pilin, který detoxifikovaný nebyl, bylo nejnižší poměrové zastoupení těchto koncentrací a to jak u bakterie *B. cepacia* (0,05 g/l ku 1,32 g/l) tak i u bakterie *B. sacchari* (0,06 g/l ku 1,37 g/l).

## 5 ZÁVĚR

- Diplomová práce byla zaměřena na studium detoxifikace hydrolyzátů lignocelulózových materiálů a následná produkce biopolymeru PHB bakteriemi *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari*. Práce je rozdělena na dvě části, kdy první část je zaměřena na způsoby detoxifikace modelových a reálných hydrolyzátů z dřevěných pilin. V připravených hydrolyzátech byl stanovený obsah polyfenolů a redukujících sacharidů pomocí spektrofotometrie. Iontovou chromatografií byl stanovený obsah organických sloučenin v modelových hydrolyzátech. Druhá část práce byla zaměřena na schopnosti akumulovat PHA vybranými druhy bakterií na připravených hydrolyzátech. Bakterie *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* byly kultivovány na modelových a reálných hydrolyzátech, kde byl gravimetricky stanoven obsah biomasy a pomocí plynové chromatografie byl stanoven obsah PHB.
- Byla provedena chemická hydrolyza modelového hydrolyzátu a chemická hydrolyza pilin – reálný hydrolyzát, při použití 2% kyseliny sírové s koncentrací pilin 50 g/l. U modelového hydrolyzátu bylo nejlepších výsledků dosaženo při detoxifikaci overlimingem s koncentrací polyfenolů před detoxifikací byla 1807,03 g/l a po detoxifikaci pak 40,69 mg/l. Efektivita detoxifikace overlimingem tak dosáhla 97,8 %. Srovnatelnou účinnost eliminace polyfenolů měl i detoxifikace modelového hydrolyzátu pomocí aktivního uhlí, nicméně v tomto případě bylo současně s inhibujícími polyfenoly odstraněno také velké množství utilizovatelných sacharidů. Koncentrace redukujících sacharidů takto detoxifikovaného modelového hydrolyzátu byla před detoxifikací 14,55 g/l a po detoxifikaci 13,90 g/l.
- Na rozdíl od modelového hydrolyzátu bylo u reálného hydrolyzátu z pilin, dosaženo nejlepších výsledků při detoxifikaci lignitem a aktivním uhlím. Je pravděpodobné, že odlišná efektivita odstranění je dána odlišným profilem polyfenolických látek v modelovém a reálném hydrolyzátu. Koncentrace polyfenolů v hydrolyzátu detoxifikovaného lignitem byla před detoxifikací 128,21 mg/l a po detoxifikaci 46,9 mg/l. Efektivita detoxifikace byla 63,4 %. Koncentrace redukujících sacharidů v reálném hydrolyzátu detoxifikovaném lignitem byla před detoxifikací 2,72 g/l a po detoxifikaci 2,38 g/l. Koncentrace polyfenolů v hydrolyzátu, který byl detoxifikovaný aktivním uhlím, byla po detoxifikaci 5,71 mg/l s efektivitou detoxifikace 95,6 %. Koncentrace redukujících sacharidů v takto reálném hydrolyzátu detoxifikovaném aktivním uhlím byla po detoxifikaci 1,64 g/l.
- Pro další práci byl vybraný modelový hydrolyzát, ve kterém byl stanoven obsah organických kyselin pomocí iontové chromatografie s vodivostním detektorem. Tento experiment prokázal, že použité detoxifikační metody vykazují pouze nízkou efektivitu při eliminaci acetátu, účinnost odstranění levulinátu byla vyšší, nicméně i v tomto případě zůstalo po detoxifikaci v hydrolyzátu významné množství (více než 40 %) této organické kyseliny.
- Kultivace *Burkholderia cepacia* a *Burkholderia sacchari* byla uskutečněná jak na nedetoxifikovaných, tak i na detoxifikovaných modelových a reálných hydrolyzátech. Bakterie *Burkholderia sacchari* byla celkově lepším producentem PHB jak v modelovém, tak i v reálném hydrolyzátu než *Burkholderia cepacia*. Obsah PHB po kultivaci na médiu modelového hydrolyzátu detoxifikovaného metodou overliming



byl 35,8 % z celkové koncentrace biomasy 3,50 g/l. Nejlépe detoxifikovaný reálný hydrolyzát byl lignitový hydrolyzát s obsahem PHB 18,3 % z celkové koncentrace biomasy 1,37 g/l.

- Při kultivaci na modelovém hydrolyzátu nebyl pozitivní efekt detoxifikačního procesu patrný, naopak vedla detoxifikace ke snížení výtěžků PHB. Naopak reálného hydrolyzátu byl pozitivní efekt detoxifikace zřejmý prakticky ve všech případech. Je možné, že rozdíl mezi modelovým a reálným hydrolyzátem je způsoben odlišným profilem přítomných inhibitorů a také nižší koncentrací redukujících sacharidů v reálném hydrolyzátu, která neumožnila tak efektivní adaptaci mikroorganismů na stresové podmínky a efekt detoxifikace byl tak více evidentní. Obecně je možné konstatovat, že jako nejefektivnější postup se jeví overliming.
- Nicméně výtěžky PHB dosažených na reálném hydrolyzátu jsou spíše nízké a nemohou být považovány za podklad k ekonomicky rentabilní produkci PHB z odpadní dřevní biomasy.

## 6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] BALAT, Mustafa. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management* [online]. 2011, **52**(2), 858-875 [cit. 2017-02-08]. DOI: 10.1016/j.enconman.2010.08.013. ISBN 10.1016/j.enconman.2010.08.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196890410003791>
- [2] JÖNSSON, Leif J. a Carlos MARTÍN. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology* [online]. 2016, **199**, 103-112 [cit. 2017-02-08]. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.10.009. ISBN 10.1016/j.biortech.2015.10.009. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852415014042>
- [3] ŠULÁK, Martin a Daniela ŠMOGROVIČOVÁ. Bioetanol: Súčasný trendy vo výskume a v praxi. *Chem. Listy* [online]. 2008, **102**, 108-115 [cit. 2017-02-10]. Dostupné z: [www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008\\_02\\_108-115.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_02_108-115.pdf)
- [4] *Structure of lignocellulose* [online]. USA: Nature Education, 2014 [cit. 2016-12-04]. Dostupné z: <http://www.nature.com/scitable/content/structure-of-lignocellulose-14464273>
- [5] ANDRLOVÁ, K. *Optimalizace produkce bioethanolu s využitím Zymomonas mobilis*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 92 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D.
- [6] SAINI, Jitendra Kumar, Anil Kumar PATEL, Mukund ADSUL a Reeta Rani SINGHANIA. Cellulase adsorption on lignin: A roadblock for economic hydrolysis of biomass. *Renewable Energy* [online]. 2016, **98**, 29-42 [cit. 2017-02-08]. DOI: 10.1016/j.renene.2016.03.089. ISBN 10.1016/j.renene.2016.03.089. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960148116302737>
- [7] ZABED, H., J.N. SAHU, A.N. BOYCE a G. FARUQ. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable and Sustainable Energy Review* [online]. 2014, **66**, 751-774 [cit. 2017-02-08]. DOI: 10.1016/j.rser.2016.08.038. ISBN 10.1016/j.rser.2016.08.038. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032116304695>
- [8] TOMEČKOVÁ, A. *Využití Kluyveromyces marxianus k produkci bioethanolu z odpadního papíru*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 90 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D.
- [9] LADICKÝ, P. *Využití pilin jako substrátu pro biotechnologickou produkci PHA*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 55 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
- [10] PALMQVIST, Eva a Bärbel HAHN-HÄGERDAL. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology* [online]. 2000, **74**(1), 25-33 [cit. 2017-02-11]. DOI: 10.1016/S0960-

- 8524(99)00161-3. ISBN 10.1016/S0960-8524(99)00161-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852499001613>
- [11] MIYAFUJI, Hisashi, Herbert DANNER, Markus NEUREITER, Christiane THOMASSER, Jane BVOCHORA, Oliver SZOLAR a Rudolf BRAUN. Detoxification of wood hydrolysates with wood charcoal for increasing the fermentability of hydrolysates. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2003, **32**(3-4), 396-400 [cit. 2017-02-11]. DOI: 10.1016/S0141-0229(02)00308-3. ISBN 10.1016/S0141-0229(02)00308-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022902003083>
- [12] MUSSATTO, S. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technology* [online]. 2004, **93**(1), 1-10 [cit. 2017-02-11]. DOI: 10.1016/j.biortech.2003.10.005. ISBN 10.1016/j.biortech.2003.10.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852403002827>
- [13] PALMQVIST, Eva a Bärbel HAHN-HÄGERDAL. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology* [online]. 2000, **74**(1), 17-24 [cit. 2017-02-11]. DOI: 10.1016/S0960-8524(99)00160-1. ISBN 10.1016/S0960-8524(99)00160-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852499001601>
- [14] DASGUPTA, Diptarka, Sheetal BANDHU, Dilip K. ADHIKARI a Debashish GHOSH. Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: A review. *Microbiological Research* [online]. 2017, **197**, 9-21 [cit. 2017-02-14]. DOI: 10.1016/j.micres.2016.12.012. ISBN 10.1016/j.micres.2016.12.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S094450131630708X>
- [15] CAVKA, Adnan a Leif J. JÖNSSON. Detoxification of lignocellulosic hydrolysates using sodium borohydride. *Bioresource Technology* [online]. 2013, **136**, 368-376 [cit. 2017-02-14]. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.03.014. ISBN 10.1016/j.biortech.2013.03.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852413003696>
- [16] MOŹEJKO-CIESIELSKA, Justyna a Robert KIEWISZ. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research* [online]. 2016, **192**, 271-282 [cit. 2017-02-15]. DOI: 10.1016/j.micres.2016.07.010. ISBN 10.1016/j.micres.2016.07.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S094450131630043X>
- [17] CIESIELSKI, Slawomir, Justyna MOŹEJKO a Nipon PISUTPAISAL. Plant oils as promising substrates for polyhydroxyalkanoates production. *Journal of Cleaner Production* [online]. 2016, **106**, 408-421 [cit. 2017-02-15]. DOI: 10.1016/j.jclepro.2014.09.040. ISBN 10.1016/j.jclepro.2014.09.040. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959652614009706>
- [18] OBRUCA, Stanislav, Pavla BENESOVA, Sinisa PETRIK, Jana OBORNA, Radek PRIKRYL a Ivana MAROVA. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds. *Process Biochemistry* [online]. 2014, **49**(9), 1409-

- 1414 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1016/j.procbio.2014.05.013. ISBN 10.1016/j.procbio.2014.05.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511314003158>
- [19] SUDESH, Kumar. *Polyhydroxyalkanoates from palm oil biodegradable plastics* [online]. Heidelberg: Springer, 2013 [cit. 2017-02-25]. ISBN 978-364-2335-396. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?id=0GbWWSWEVOIC&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbg\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.cz/books?id=0GbWWSWEVOIC&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbg_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- [20] CHEN, Guo-Qiang, Xiao-Ran JIANG a Yingying GUO. Synthetic biology of microbes synthesizing polyhydroxyalkanoates (PHA). *Synthetic and Systems Biotechnology* [online]. 2016, **1**(4), 236-242 [cit. 2017-02-21]. DOI: 10.1016/j.synbio.2016.09.006. ISSN 2405805x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405805X16300448>
- [21] Bakterie a olej od hranolek zachraňují svět. Bakterie a olej od hranolek zachraňují svět [online]. 2015 [cit. 2017-02-25]. Dostupné z: <http://www.mmspektrum.com/clanek/bakterie-a-olej-od-hranolek-zachranujisvet.html>
- [22] WANG, Ying, Jin YIN a Guo-Qiang CHEN. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2014, **30**, 59-65 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.06.001. ISSN 09581669. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166914001037>
- [23] CZERNIECKA, A., A. MAGOŃ, J. SCHLIESSER, B.F. WOODFIELD a M. PYDA. Heat capacity of poly(3-hydroxybutyrate). *The Journal of Chemical Thermodynamics* [online]. 2014, **73**, 76-84 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1016/j.jct.2013.10.020. ISSN 00219614. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196141300387X>
- [24] VOLOVA, Tatiana, Ekaterina SHISHATSKAYA, Viktor SEVASTIANOV, Sergei EFREMOV a Olga MOGILNAYA. Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2003, **16**(2), 125-133 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1016/S1369-703X(03)00038-X. ISBN 10.1016/S1369-703X(03)00038-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X0300038X>
- [25] WANG, Yuanpeng, Jiyuan CAI, Jianghuang LAN, Zhenggui LIU, Ning HE, Liang SHEN a Qingbiao LI. Biosynthesis of poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) from the acclimated activated sludge and microbial characterization in this process. *Bioresource Technology* [online]. 2013, **148**, 61-69 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.08.102. ISBN 10.1016/j.biortech.2013.08.102. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852413013539>
- [26] ZHU, Chengjun, Christopher T. NOMURA, Joseph A. PERROTTA, Arthur J. STIPANOVIC a James P. NAKAS. The effect of nucleating agents on physical properties of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHB-co-HV) produced by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759. *Polymer Testing* [online]. 2012, **31**(5), 579-585 [cit. 2017-02-25]. DOI:

10.1016/j.polymertesting.2012.03.004. ISSN 01429418. Dostupné z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142941812000487>

- [27] PANDEY, Jitendra. *Handbook of polymernanocomposites. processing, performance and application - volume A: layered silicates* [online]. Vol. A. Berlin Heidelberg: Springer, 2014 [cit. 2017-02-25]. ISBN 978-364-2386-497. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=qfi3BAAAQBAJ&pg=PA3&dq=PHBV+unit&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwix-Imo6qrSAhXDCpoKHQ-HDJwQ6AEIMzAE#v=onepage&q=PHBV%20unit&f=false>
- [28] OBRUČA, S.: *Controlled production and degradation of selected biomaterials*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 169 s. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [29] SRINIVASAN, Shoba, N.C. ARORA a Kavita SAHAI. Report on the newly emerging nosocomial Burkholderia cepacia in a tertiary hospital. *Medical Journal Armed Forces India* [online]. 2016, **72**(1), s50-s53 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1016/j.mjafi.2016.03.003. ISBN 10.1016/j.mjafi.2016.03.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377123716000575>
- [30] LU, Tingting, Chao XUE, Jihai SHAO, Ji-Dong GU, Qingru ZENG a Si LUO. Adsorption of dibutyl phthalate on Burkholderia cepacia, minerals, and their mixtures: Behaviors and mechanisms. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. 2016, **114**, 1-7 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1016/j.ibiod.2016.05.015. ISBN 10.1016/j.ibiod.2016.05.015. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830516301639>
- [31] MENDONÇA, Thatiane T., Rafaela R. TAVARES, Lucas G. CESPEDES, Ruben J. SÁNCHEZ-RODRIGUEZ, Jan SCHRIPEMA, Marilda K. TACIRO, José G.C. GOMEZ a Luiziana F. SILVA. Combining molecular and bioprocess techniques to produce poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with controlled monomer composition by Burkholderia sacchari. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2017, **4** [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.013. ISBN 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016319109>
- [32] CESÁRIO, M. Teresa, Rodrigo S. RAPOSO, M. Catarina M.D. de ALMEIDA, Frederik VAN KEULEN, Bruno S. FERREIRA, João P. TELO a M. Manuela R. da FONSECA. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by Burkholderia sacchari using wheat straw hydrolysates and gamma-butyrolactone. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2014, **71**, 59-67 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.04.054. ISSN 01418130. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813014002815>
- [33] NUMATA, Keiji, Hideki ABE a Tadahisa IWATA. Biodegradability of Poly(hydroxyalkanoate) Materials. *Materials* [online]. 2009, **2**(3), 1104-1126 [cit. 2017-02-28]. DOI: 10.3390/ma2031104. ISBN 10.3390/ma2031104. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/2/3/1104/>

- [34] KE, Y., X.Y. ZHANG, S. RAMAKRISHNA, L.M. HE a G. WU. Reactive blends based on polyhydroxyalkanoates: Preparation and biomedical application. *Materials Science and Engineering C* [online]. 2017, **70**, 1107-1119 [cit. 2017-02-16]. DOI: 10.1016/j.msec.2016.03.114. ISBN 10.1016/j.msec.2016.03.114. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116302971>
- [35] STRATTON, Scott, Namdev B. SHELKE, Kazunori HOSHINO, Swetha RUDRAIAH a Sangamesh G. KUMBAR. Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2014, **71**(2), 59-67 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2016.11.001. ISBN 10.1016/j.bioactmat.2016.11.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452199X16300238>